

**UNIVERZITA KARLOVA**

**2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

**Studijní program: Fyziologie a patofyziologie člověka**



**MUDr. Šárka Malá**

**Vztah metabolismu, autonomní neuropatie a cévního postižení u pacientů s diabetem  
mellitem 1. a 2. typu**

*Relationship between metabolism, autonomic neuropathy and vascular disease in patients  
with type 1 and type 2 diabetes mellitus*

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Školitel: doc. MUDr. Radan Keil, PhD.**

**Konzultant: doc. MUDr. Lucie Riedlbauchová, PhD.**

Praha, 2020

**Identifikační záznam:**

MALÁ, Šárka. *Vztah metabolismu, autonomní neuropatie a cévního postižení u pacientů s diabetem mellitem 1. a 2. typu. [Relationship between metabolism, autonomic neuropathy and vascular disease in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus]*. Praha, 2020. 132 s., 3 příl. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Interní klinika 2. LF UK a FN v Motole. Vedoucí práce doc. MUDr. Radan Keil, Ph.D.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma "Vztah metabolismu, autonomní neuropatie a cévního postižení u pacientů s diabetem mellitem 1. a 2. typu" zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 6.11.2020

MUDr. Šárka Malá

Podpis:

### **Poděkování:**

Chtěla bych poděkovat svému školiteli, doc. MUDr. Radanu Keilovi, Ph.D., za podporu a motivaci v mé vědecké práci.

Velký dík patří i mé školitelce konzultantce doc. MUDr. Lucii Riedlbauchové, Ph.D., za její čas a odborné rady.

Dále bych chtěla poděkovat MUDr. Janu Brožovi, MUDr. Lucii Hoskovcové, MUDr. Veronice Potočkové a Ing. Jakubovi Schlenkerovi, Ph.D., za dlouholetou spolupráci, cenné připomínky a pozitivní přístup.

Děkuji MUDr. Pavlíně Pitřhové, Ph.D., za provedení měření intimomediální šíře karotických tepen našich probandů.

Ing. Markovi Brabcovi, Ph.D. a Ing. Antonínu Hoskovcovi patří velké poděkování za pomoc se zpracováním statistické analýzy.

Moc děkuji prof. MUDr. Kateřině Štechové, Ph.D., za pomoc s revizí mé disertační práce a motivaci k vědeckému bádání.

V neposlední řadě děkuji také mé rodině a přátelům za jejich neutuchající podporu a pomoc.



# Obsah

1. Úvod	7
2. Základní fakta o diabetes mellitus 1. a 2. typu	10
2.1. Diabetes mellitus 1. typu	10
2.2. Diabetes mellitus 2. typu	11
3. Chronické komplikace diabetes mellitus	13
3.1. Klasifikace	13
3.2. Patofyziologie	13
3.2.1. Efekty hyperglykémie	14
3.2.1.1. Neenzymová glykace	14
3.2.1.2. Polyolová cesta	15
3.2.1.3. Aktivace proteinkinázy C	16
3.2.1.4. Hexosaminová signální cesta	17
3.2.1.5. Oxidační stres	17
3.2.2. Inzulínová rezistence	18
3.2.3. Arteriální hypertenze	20
3.2.4. Nadváha a obezita	21
3.2.5. Dyslipidémie	22
3.2.6. Kouření	23
3.3. Diabetická autonomní neuropatie	24
3.3.1. Patogeneze diabetické autonomní neuropatie	25
3.3.2. Kardiální autonomní neuropatie	25
3.4. Ateroskleróza a diabetes mellitus	27
3.4.1. Vztah kardiální autonomní neuropatie a aterosklerózy	28
4. Hypotézy práce	30
5. Cíle výzkumu	30
6. Vztah kardiální autonomní neuropatie a aterosklerotického postižení karotických tepen u pacientů s diabetes mellitus 1. a 2. typu	31
6.1. Metodika	31
6.1.1. Studovaná skupina	31
6.1.2. Obecné vyšetření a zhodnocení mikrovaskulárních komplikací	31
6.1.3. Vyšetření kardiální autonomní neuropatie	32
6.1.4. Vyšetření karotických tepen	33

6.1.5.	Statistická analýza	33
6.2.	Výsledky	34
6.2.1.	Studovaná skupina	34
6.2.2.	Statistické modely	36
6.2.2.1.	Všechna data (nediabetici, diabetici 1. a 2. typu)	36
6.2.2.2.	Modelování zaměřené na diabetes mellitus 1. typu	39
6.2.2.3.	Modelování zaměřené na diabetes mellitus 2. typu	43
6.3.	Diskuze	46
7.	Rekurentní analýza variability srdeční frekvence u pacientů s autonomní dysfunkcí	51
7.1.	Rekurentní analýza HRV u pacientů s vazovagální synkopou	51
7.1.1.	Metodika práce	51
7.1.1.1.	Studovaný soubor	51
7.1.1.2.	Vyšetření variability srdeční frekvence	52
7.1.1.3.	Analýza R-R intervalů	52
7.1.1.4.	Statistická analýza	59
7.1.2.	Výsledky	59
7.1.3.	Diskuze	65
7.2.	Rekurentní analýza HRV u pacientů s diabetickou autonomní neuropatií	67
7.2.1.	Metodika práce	67
7.2.1.1.	Studovaný soubor	67
7.2.1.2.	Vyšetření variability srdeční frekvence	67
7.2.1.3.	Rekurentní analýza HRV	68
7.2.1.4.	Statistická analýza	69
7.2.2.	Výsledky	69
7.2.3.	Diskuze	70
8.	Závěry	73
9.	Souhrn	75
10.	Seznam použitých zkratk	77
11.	Referenční seznam	81
12.	Publikační činnost	107
13.	Přílohy	110

# 1. Úvod

Diabetes mellitus je onemocnění charakterizované chronickou hyperglykemií, představující celosvětově vážný zdravotnický problém. Prevalence diabetu mellitu celosvětově stoupá. V České republice (ČR) se v roce 2000 léčilo s diabetem mellitem 654 164 pacientů, o 10 let později stoupl počet diabetiků na 806 230, v roce 2015 byl zaznamenán nárůst na 858 010 diabetických pacientů. V posledních letech stoupá výskyt tohoto onemocnění o přibližně 10 000 nově diagnostikovaných případů za rok. Podle odhadů provedených na základě dat Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR by v roce 2035 mohl být tímto onemocněním postižen každý desátý občan ČR bez ohledu na věk, přičemž jeho prevalence bude ve vyšších věkových kategoriích ještě mnohem vyšší (*Data o diabetu v ČR, 2014*). Rostoucí výskyt diabetu mellitu a jeho komplikací vede k významnému zvýšení morbidity a mortality populace s odpovídajícími zvyšujícími se náklady na diagnostiku a léčbu.

Dominující je výskyt diabetes mellitus 2. typu spojeného s inzulinovou rezistencí, který tvoří 92 % diabetické populace. Kolem 7 % diabetiků trpí diabetem mellitem 1. typu charakterizovaným absolutním nedostatkem inzulinu v důsledku autoimunitní destrukce beta buněk pankreatu. Zbýlé málo četné případy představuje diabetes gestační, monogenně podmíněný a sekundární formy (*Zvolský, 2015*).

V případě pozdní diagnostiky a léčby diabetu mellitu vede chronická hyperglykémie k alteraci metabolických drah, které podmiňují funkční i strukturální změny tkání a orgánových systémů. Chronické komplikace diabetu mellitu se pak stávají hlavní příčinou snížení kvality života, morbidity a mortality diabetiků. V roce 2013 bylo v ČR léčeno 251 712 osob, tedy 29 % diabetiků, pro diabetickou retinopatii, nefropatii či syndrom diabetické nohy. Diabetická retinopatie postihovala 11,7 % diabetiků, z nichž 2,6 % trpělo ztrátou zraku. Diabetickou nefropatii mělo diagnostikováno 10% diabetiků, z nichž třetina měla známky selhávající funkce ledvin. Syndrom diabetické nohy postihoval 5,6 % diabetiků, přičemž u 18,5 % z nich byl již nutný amputační výkon. Diabetes mellitus se tak stává hlavní příčinou slepoty, nezvratného renálního selhání s nutností umělé náhrady funkce ledvin a netraumatických amputací (*Zvolský, 2015*).

Pacienti s diabetes mellitus 1. a 2. typu mají významně vyšší riziko kardiovaskulárních onemocnění včetně ischemické choroby srdeční, cévních mozkových

příhod a ischemické choroby dolních končetin v porovnání s nediabetickou populací (*American Diabetes Association, 1989; Schwartz et al., 1992; Stamler et al., 1993*).

Kardiovaskulární onemocnění představují hlavní příčinu úmrtí u diabetických pacientů (přibližně 70%) (*Laakso, 1999; De Ferranti et al., 2014*). Pacienti s diabetem mellitem 2. typu mají 4krát vyšší riziko vzniku kardiovaskulárních příhod než lidé bez něj i po zohlednění běžných rizikových faktorů aterosklerózy jako je věk, kouření tabáku, obezita, hyperlipidémie a hypertenze. U pacientů s diabetem mellitem 1. typu jsou velké kardiovaskulární příhody (jako je infarkt myokardu, cévní mozková příhoda, náhlá srdeční smrt) třikrát častější u mužů diabetiků a až sedmkrát častější u žen diabetiček oproti nediabetické populaci (*De Ferranti et al., 2014; Buyken, 2016*).

Dlouhotrvající hyperglykémie je považována za hlavní příčinu diabetických mikrovaskulárních a makrovaskulárních komplikací (*Nathan et al., 1993; Laakso, 1999; Grundy et al., 1999*). Indukuje produkci pokročilých produktů glykace, mění intracelulární signalizační kaskády a zvyšuje oxidační stres. Všechny tyto mechanismy interagují a vedou k mnoha strukturálním a funkčním změnám cévní stěny vedoucím k rozvoji aterosklerózy. Hyperglykémie také zvyšuje agregaci trombocytů, riziko tvorby trombů a progresi aterosklerózy (*Aronson, Rayfield, 2002; Grant, 2007*). U pacientů s diabetes mellitus 2. typu způsobuje obezita a akumulace tukové tkáně změny metabolismu lipidů a tvorbu prozánětlivých markerů, inzulinová rezistence je u těchto pacientů kritickým faktorem způsobujícím vaskulární dysfunkci (*Kim et al., 2006; Paneni et al., 2013*).

Kardiální autonomní neuropatie je častou a závažnou komplikací diabetes mellitus. Manifestní kardiální autonomní neuropatie je přítomna u jedné pětiny diabetických pacientů (*Spallone et al., 2011*). Diagnóza kardiální autonomní neuropatie je asociována s vyšší prevalencí němého infarktu myokardu, systolickou i diastolickou dysfunkcí levé komory srdeční a s pětinasobným zvýšením mortality ve srovnání s diabetiky bez autonomní neuropatie (*Vinik et al., 2003; Maser et al., 2003; Vinik et al., 2007*). Výskyt kardiální autonomní neuropatie koreluje s prodloužením QT intervalu, zvyšuje riziko maligních arytmií a náhlé srdeční smrti (*Ewing et al., 1991*).

V posledních letech bylo publikováno několik menších prací prokazujících asociaci mezi kardiální autonomní neuropatií a aterosklerotickým postižením cév především u pacientů s diabetem mellitem 2. typu (*Meyer et al., 2004; Fakhrzadeh et al., 2012; Jung et al., 2013; Canani et al., 2013*).

Vyvstává tedy otázka, jak jsou kardiální autonomní neuropatie a ateroskleróza patofyziologicky propojeny. Zda jsou tyto dvě komplikace diabetu pouze nezávislými produkty chronicky neuspokojivé kompenzace glykémie či zda vzájemně interagují a mohou se patofyziologicky ovlivňovat. Vztahu kardiální autonomní neuropatie a aterosklerotického postižení cév se věnuje hlavní část mé vědecké práce.

Diagnostika kardiální autonomní neuropatie je velmi důležitá, neboť umožňuje identifikovat pacienty s výrazně vyšším kardiovaskulárním rizikem. Pacienti s kardiální autonomní neuropatií by měli být obzvláště pečlivě vyšetřeni stran rizikových faktorů aterosklerózy. Časná intervence rizikových faktorů, změna životosprávy a adekvátní farmakoterapie by mohly zpomalit aterosklerotický proces a oddálit nástup kardiovaskulárních komplikací. Zároveň informovanost a edukace postižených pacientů může výrazně zlepšit jejich spolupráci a adherenci k léčbě.

Standardní metodou vyšetření kardiální autonomní neuropatie je v současné době hodnocení variability srdeční frekvence při kardiovaskulárních reflexních testech (*Spallone et al., 2011*). Standardní parametry variability srdeční frekvence jsou vypočítávány lineárními metodami (časovou a frekvenční analýzou). Na vzniku variability srdeční frekvence se však podílejí i jevy nelineární. Jsou podmíněny komplexními interakcemi hemodynamických, elektrofyziologických a humorálních proměnných stejně jako autonomní a centrální nervovou regulací (*Malik et al., 1996*). Nelineární metody analýzy by mohli proto poskytnout cenné informace ve fyziologii vzniku variability srdeční frekvence (*Silipo et al., 1998*).

Jednu z nelineárních metod, která se zdá být slibná pro hodnocení změn variability srdeční frekvence, představuje rekurentní analýza (*Javorka et al., 2008; Schlenker et al., 2014*). Rozhodli jsme se proto náš výzkum zaměřit také na zhodnocení možnosti popisu autonomní dysfunkce pomocí rekurentní analýzy variability srdeční frekvence.

## **2. Základní fakta o diabetes mellitus 1. a 2. typu**

### **2.1. Diabetes mellitus 1. typu**

#### ***Definice a patogeneze***

Onemocnění diabetem mellitem 1. typu vzniká v důsledku destrukce  $\beta$  buněk pankreatu, která vede k absolutnímu nedostatku inzulínu a celoživotní závislosti na jeho podávání. Nejčastější příčinou je imunopatologická reakce s produkcí autoprotilátek proti řadě tělu vlastních antigenů, např. proti dekarboxyláze kyseliny glutamové, proti inzulínu, proti buňkám Langerhansových ostrůvků. Mediátorem autoimunitní reakce a zániku  $\beta$  buněk jsou aktivované T lymfocyty. Příčina rozvoje imunopatologické reakce není přesně známa, předpokládaným spouštěčem je virová infekce či styk s jiným exogenním či endogenním agens, který vede u geneticky predisponovaných jedinců k rozvoji autoimunity. Ke klinické manifestaci onemocnění dochází v okamžiku, kdy je zničeno více jak 85% inzulín produkující tkáně pankreatu. Absolutní nedostatek inzulínu má za následek pro diabetes mellitus typickou hyperglykémii s provázející poruchou metabolismu sacharidů, tuků i bílkovin (*Pelikánová et al., 2011, s. 60*).

#### ***Výskyt***

V roce 2015 bylo v České republice sledováno v diabetologických ambulancích 57945 pacientů s diabetem mellitem 1. typu, což tvoří přibližně 7% z celkového počtu diabetiků v ČR (*Data o diabetu v ČR, 2014*).

#### ***Klinická manifestace***

Onemocnění se může objevit v kterémkoliv věku, rychlost rozvoje klinických příznaků závisí na agresivitě autoimunitního procesu a rychlosti destrukce  $\beta$  buněk. Do klasického klinického obrazu patří polyurie, nykturie, žízeň, polydipsie, hubnutí při normální chuti k jídlu, únavnost, poruchy zrakové ostrosti. V dětství a adolescenci bývá zánik inzulín produkující tkáně velmi rychlý, často s akutním rozvojem ketoacidózy a poruchou vědomí. U menší části pacientů s manifestací onemocnění v dospělosti s pomalou destrukcí beta buněk může zbytková sekrece inzulínu bránit rychlému rozvoji ketoacidózy (*Pelikánová et al., 2011, s. 60*). U této malé části pacientů se může dlouhodobá hyperglykémie projevit náchylností k infekcím především urogenitálního traktu (infekce močových cest, vulvovaginitidy,

balanitidy) a kůže (furunkl, karbunkl) či v extrémním případě až příznaky pozdních komplikací (poruchy vizu, parestezie dolních končetin a další).

### ***Diagnostika***

Diagnostika diabetes mellitus se opírá o průkaz hyperglykémie ve venózní plazmě. V případě autoimunitně podmíněného diabetu mellitu 1. typu prokazujeme též specifické autoprotilátky, v klinické praxi se nyní stanovují protilátky proti inzulínu (IAA), dekarboxyláze kyseliny glutamové (anti-GAD65) a tyrozinkináze (anti-IA2).

### ***Terapie***

Terapie spočívá v celoživotním podávání inzulínu s cílem dosažení normoglykémie. Podáván bývá většinou inzulínovými pery. K pokrytí bazální sekrece inzulínu se podává jednou denně dlouhodobě působící inzulín, k pokrytí prandiální sekrece rychle působící inzulín. Ve specifických indikacích se používá kontinuální podávání rychle působícího inzulínu do podkoží tzv. "inzulínovou pumpou". Kompenzaci glykémie může zlepšit i podávání gliflozínů, které snižují zpětnou absorpci glukózy v proximálním tubulu ledvin.

## **2.2. Diabetes mellitus 2. typu**

### ***Definice a patogeneze***

Dlouhodobá hyperglykémie je u diabetu mellitu 2. typu podmíněna rezistencí k inzulínu, která vede k jeho nedostatečnému účinku v tkáních. Po určitou dobu je hyperglykémie kompenzována zvýšenou produkcí inzulínu  $\beta$  buňkami, s vystupňovanou inzulínovou rezistencí však buňky pankreatu již nedokážou pokrýt nároky tkání a dochází k relativnímu nedostatku inzulínu a hyperglykémii. Na vzniku onemocnění se podílí genetická predispozice, onemocnění je polygenní, fenotyp je dále modulován vnějšími faktory, jako je obezita, stres, nízká fyzická aktivita či kouření (*Pelikánová et al., 2011, s. 61*).

### ***Výskyt***

V roce 2015 bylo v České republice léčeno pro diabetes mellitus 2. typu 785586 pacientů, 92 % diabetické populace ČR (*Data o diabetu v ČR, 2014*).

## ***Klinická manifestace***

Diabetes mellitus 2. typu se manifestuje nejčastěji v dospělosti, obvykle po dosažení 40. roku věku (*Pelikánová et al., 2011, s. 101*). K rozvoji glukoregulační poruchy dochází většinou pomalu. U většiny pacientů se setkáváme s neurčitými příznaky únavy, vyššího pocitu žízně, častějšího močení. Často jsou první roky po propuknutí onemocnění oligosymptomatické a ke klinickým projevům dochází až s nástupem pozdních komplikací (porucha vizu při retinopatii, poruchy citlivosti dolních končetin při neuropatii, defekty nohou při syndromu diabetické nohy, projevy ischemické choroby srdeční, klaudikace při ischemické chorobě dolních končetin, ikty). Většina pacientů má v době manifestace choroby i další projevy metabolického syndromu (arteriální hypertenze, dyslipidémie, obezita) (*Češka et al., 2010, s. 246*). Poměrně vzácně, především u starších pacientů, může být prvním příznakem onemocnění hyperglykemické hyperosmolární kóma.

## ***Diagnostika***

Základem diagnostiky je průkaz hyperglykémie v žilní krvi. Typicky bývá u diabetes mellitus 2. typu zaznamenána zvýšená produkce inzulínu průkazem zvýšených hladin C-peptidu, molekuly odštěpované při jeho sekreci. Pro diabetes mellitus 1. typu specifické autoprotilátky (IAA, anti-GAD65 a anti-IA2) jsou negativní.

## ***Terapie***

Pilířem terapie diabetu mellitu 2. typu by měla být dietní a režimová opatření doplňovaná o farmakologickou léčbu. Základem je mírně redukční dieta s omezeným množstvím sacharidů do 200g denně. Nevhodné je používání sacharidů s vysokým glykemickým indexem a rychlým vstřebáváním z gastrointestinálního traktu. Pacientům je doporučována fyzická aktivita formou aerobního tréninku alespoň 4x týdně po dobu 30 minut. Vhodné je vzhledem k vysokému riziku kardiovaskulárních komplikací zanechat kouření. Farmakologicky je možné využít celou škálu antidiabetických léků. Lékem první volby je biguanid metformin. K ovlivnění inzulínové rezistence jsou dále používány glitazony. K zvýšení inzulínové sekrece se podávají deriváty sulfonylurey a glinidy. Navyšující je trend použití léků k ovlivnění inkretinového systému - gliptiny a GLP-1 analoga. V posledních letech se začaly využívat glifloziny, selektivní inhibitory vstřebávání glukózy v proximálním tubulu ledvin. Téměř opuštěno bylo podávání inhibitorů střevních glukosidáz pro nízkou adherenci k léčbě. V případě, kdy podávání perorálních antidiabetik nestačí k dosažení uspokojivé kompenzace glykémie, přidává se do terapie inzulín.



### 3. Chronické komplikace diabetes mellitus

#### 3.1. Klasifikace

Diabetes mellitus 1. i 2. typu vedou k rozvoji komplikací postihujících celou řadu orgánových systémů. Obecně jsou klasifikovány na vaskulární a nevaskulární. Vaskulární komplikace jsou dále děleny na mikrovaskulární (retinopatie, nefropatie, neuropatie) a makrovaskulární (ischemická choroba srdeční, ischemická choroba dolních končetin, cerebrovaskulární onemocnění). Mikrovaskulární komplikace jsou pro diabetes mellitus specifické. Makrovaskulární postižení aterosklerózou se vyskytuje i v nediabetické populaci, avšak riziko makrovaskulárních komplikací je u diabetiků signifikantně vyšší (*Powers, 2015, s. 2422*). Nejvýznamnější komplikace shrnuje Tabulka 1.

**Tabulka 1 – Chronické komplikace diabetes mellitus**

<i>Vaskulární</i>		<i>Nevaskulární</i>
<b>mikrovaskulární</b>	<b>makrovaskulární</b>	glaukom
retinopatie	ischemická choroba srdeční	katarakta
nefropatie	ischemická choroba dolních končetin	paradontitis
neuropatie	cerebrovaskulární onemocnění	infekce a další

#### 3.2. Patofyziologie

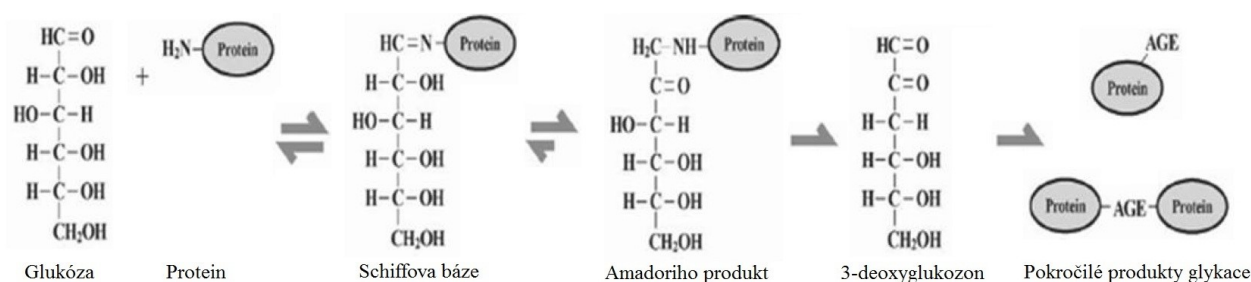
Chronická hyperglykémie je považována za hlavní příčinu diabetických mikrovaskulárních i makrovaskulárních komplikací. Dlouhotrvající hyperglykémie indukuje prostřednictvím neenzymové glykace tvorbu pokročilých produktů glykace (advanced glycation endproducts - AGEs), mění intracelulární signalizační kaskády a zvyšuje oxidační stres. Všechny tyto mechanismy interagují a vedou k mnoha strukturálním a funkčním změnám cévní stěny i dalších tkání (*Nathan et al., 1993; Laakso, 1999; Grundy et al., 1999*).

Rozvoj diabetických komplikací je dále modifikován genetickou výbavou jedince, jeho individuální vnímavostí a dalšími faktory (jako je arteriální hypertenze, kouření, dyslipidémie). U pacientů s diabetes mellitus 2. typu má kritickou úlohu v rozvoji vaskulární dysfunkce inzulinová rezistence. U těchto pacientů způsobuje obezita a akumulace tukové tkáně změny metabolismu lipidů a tvorbu prozánětlivých markerů, které se dále účastní rozvoje pozdních komplikací (*Beckman et al., 2002; Kim et al., 2006*).

### 3.2.1. Efekty hyperglykémie

#### 3.2.1.1. Neenzymová glykace

Diabetes mellitus se vyznačuje poruchou utilizace glukózy, která vede k jejímu hromadění v extra i intracelulárním prostoru. Proteiny mohou spontánně vázat glukózu kovalentní vazbou a integrovat ji tak do své molekuly. Tento děj probíhá bez katalytického působení enzymů, proto je označován jako neenzymová glykace proteinů (*Škrha, 2011, s. 374*). Je zahájena reakcí karbonylové skupiny redukujícího cukru s volnou aminoskupinou na N-konci proteinu za vzniku nestabilního aldiminu (Schiffova báze). Množství vznikajících bází je přitom přímo úměrné hladině glukózy. Schiffovy báze konvertují Amadoriho přesmykem na stabilnější ketoamin (Amadoriho produkt). Časem Amadoriho produkty podléhají celé řadě reakcí včetně oxidace a cyklizace za vzniku pokročilých produktů glykace. Vznik AGEs je doprovázen tvorbou řady forem reaktivního kyslíku, oxoaldehydů, které dále reagují a poškozují proteiny a další důležité biomolekuly (*Younus, Anwar, 2016*). Popsané reakce neenzymové glykace zobrazuje Obrázek 1.



**Obrázek 1 - Neenzymová glykace proteinů (upraveno dle Younus 2016)**

Množství vznikajících produktů neenzymové glykace je závislé na hladině redukujícího cukru a době jeho působení. Akumulace AGEs je závislá na biologickém poločasu změněného proteinu. Změna chemické struktury a molekuly proteinu ovlivňuje jeho fyzikální a chemické vlastnosti a funkci. Například u kolagenu jde o změny pevnosti, elasticity, odolnosti vůči proteázám. Glykace strukturálních proteinů krvinek ovlivňuje jejich agregabilitu a deformabilitu (*Škrha, 2011, s. 375*). Neenzymová glykace proteinů extracelulární matrix ovlivňuje mezibuněčnou signalizaci, intracelulárně jsou alterovány i proteiny regulující genovou transkripci (*Brownlee, 2001*).

Interakce AGEs s jejich receptory na povrchu buněk (tzv. RAGE) spouští kaskádu aktivačních reakcí, které vedou k uvolnění zánětlivých cytokinů, růstových faktorů a signálních molekul, které alterují morfologii a funkci ovlivněných tkání a orgánů. Po vazbě AGEs na receptory makrofágů dochází k uvolnění interleukinu 1 a tumor nekrotizujícího

faktoru alfa, kteří zahajují zánětlivou reakci. Cytokiny působí na trombocyty, endotelové buňky a ovlivňují tak koagulační děje, tvorbu růstových faktorů (např. fibroblastový růstový faktor - FGF) a stimulují produkci extracelulární matrix. Následná akumulace glykosaminoglykanů a kolagenu v bazální membráně kapilár způsobuje poruchu cévní permeability. RAGE se nacházejí také přímo na endotelových buňkách, aktivují syntézu cytoadhezivních molekul a ovlivňují interakce buněčné stěny s cirkulujícími elementy (*Škrha, 2011, s. 375*).

Glykace proteinů tak hraje významnou roli v procesech stárnutí, rozvoji diabetických komplikací, aterosklerózy, neurodegenerativních onemocnění a chronického selhání ledvin (*Brownlee, 1995; Younus, Anwar, 2016*).

### **3.2.1.2. Polyolová cesta**

Polyolová dráha je založena na funkci aldózoreduktázy. Hlavní funkcí tohoto enzymu v buňce je redukovat toxické aldehydy na inaktivní alkoholy. V případě hyperglykémie se zvyšuje afinita aldózoreduktázy ke glukóze a ta je redukována na sorbitol za využití nikotinamidadenindinukleotidfosfátu (NADPH) jako donora vodíkových kationtů. Sorbitol je vysoce hydrofilní alkohol a neprostupuje skrz buněčnou membránu, při jeho hromadění intracelulárně dochází k osmoticky aktivnímu přestupu vody do nitra buněk a jejich poškození. Tento jev byl pozorován například v oční čočce či pericytech kapilár. Zvýšení sorbitolu má za následek také snížení aktivity Na/K-ATPázy, která je zásadní pro udržení elektrochemické integrity buňky (*Škrha, 2011, s. 377*). NADPH je hlavním kofaktorem regenerace intracelulárních antioxidantů, spotřeba NADPH aldózoreduktázou vede k jeho nižší dostupnosti pro glutathionreduktázu, jejíž funkce je zásadní k redukcí oxidovaného glutathionu a schopnosti buňky reagovat na oxidační stres. Nahromaděný sorbitol je dále přeměňován sorbitoldehydrogenázou na fruktózu, což vede ke zvýšené spotřebě oxidované formy nikotinamidadenindinukleotidu (NAD<sup>+</sup>) a konverzi na NADH. NADH je substrátem pro NADH oxidázu, která generuje vznik reaktivních forem kyslíku (ROS) a zvyšuje oxidační stres. Fruktóza může být dále fosforylována na fruktóza-3-fosfát a přeměněna na 3-deoxyglukozon účastníci se tvorby AGEs a dále vést k buněčnému poškození (*Mathebula, 2015*). Zmíněné procesy shrnuje Obrázek 2.



uvolnění cytokinů a růstových faktorů, které následně stimulují tvorbu extracelulární matrix a buněčnou proliferaci (*Ways, Sheetz, 2000*). Stimulace proteinkinázy C tak vede k endotelové dysfunkci, změnám kontraktility a permeability cévní stěny, angiogenezi, alteraci růstu, migrace a funkce hladkosvalových buněk (*Idris et al., 2001*). Aktivovaná proteinkináza C má dle současných znalostí klíčovou úlohu v patogenezi vaskulárních komplikací.

#### **3.2.1.4. Hexosaminová signalizační cesta**

Glukóza je po vstupu do buňky rychle fosforylována na glukóza-6-fosfát, ten se konvertuje na fruktóza-6-fosfát a dále metabolizuje cestou glykolýzy. Malá část fruktóza-6-fosfátu se přeměňuje za přítomnosti glutaminu na glukosamin-6-fosfát pomocí enzymu glutamin:fruktóza-6-fosfát aminotransferázy (GFAT). Tato metabolická cesta je označována jako hexosaminová signalizační dráha (*Škrha, 2011, s. 378*). Vzniklý glukosamin-6-fosfát váže serinové a threoninové boční řetězce proteinů. Tato posttranslační modifikace proteinových molekul mění funkci klíčových enzymů, membránových proteinů a transkripčních faktorů. Hexosaminová cesta alteruje funkci signálních molekul, které ovlivňují sacharidový i lipidový metabolismus a zvyšuje inzulínovou rezistenci (*Stefano et al., 2016*). Glukosaminová modifikace postihuje mitochondriální proteiny respiračního komplexu a je spojována s poruchou mitochondriální funkce diabetických kardiomyocytů (*Tan et al., 2014*).

#### **3.2.1.5. Oxidační stres**

Bylo prokázáno, že hyperglykemií indukovaný oxidační stres je asociován s mikrovaskulárními i makrovaskulárními komplikacemi diabetu mellitu a dysfunkcí imunitního systému (*Nicolls et al., 2007; Giacco et al., 2010*).

Glukóza je cenným zdrojem energie. Energetický nosič ve formě adenosintrifosfátu (ATP) je produkován anaerobním i aerobním rozkladem molekuly glukózy. Aerobní glykolýza cestou oxidativní fosforylace v mitochondriích je mnohem efektivnějším zdrojem ATP, zároveň však vede k tvorbě volných radikálů (zejména superoxidového aniontu). Mitochondriální respirační řetězec je považován za hlavní zdroj tvorby volných radikálů (*Yaribeygi et al., 2019*). Kromě toho molekuly glukózy podléhají autooxidaci za tvorby peroxidu vodíku a dalších molekul zvyšujících oxidační stres. Hydroxylové skupiny glukózy se mohou účastnit přeskupení elektronů a podílet se na vzniku reaktivních forem kyslíku. Glukóza vázaná v buněčných molekulách může tímto mechanismem měnit vlastnosti strukturálních částí buněčné membrány (např. peroxidace lipidů) s následnou poruchou její permeability (*Škrha, 2011, s. 379*). Volné radikály jsou produkovány také cestou neenzymové

glykace při tvorbě AGEs a vazbě AGEs na jejich receptory RAGE (Yaribeygi et al., 2019). Dalším mechanismem je tvorba sorbitolu v polyolové cestě. Ta je závislá na dodávce NADPH. NADPH je kofaktorem glutathionperoxidázy nezbytné pro redukci oxidované formy glutathionu. Snížení nabídky NADPH tak snižuje antioxidační schopnost buněk a umožňuje vyšší uplatnění oxidačního stresu (Škrha, 2011, s. 379).

### 3.2.2. Inzulínová rezistence

Inzulínová rezistence je patologický stav, kdy je snížena biologická odpověď inzulín-senzitivních tkání (jako jsou kosterní svaly, tuková tkáň, játra) na normální hladiny inzulínu. Klinicky je inzulínová rezistence definována jako neschopnost známého množství exogenního či endogenního inzulínu zvýšit využití glukózy jedince stejně, jak je tomu ve zdravé populaci (Lebovitz, 2001). Inzulínová rezistence hraje klíčovou roli v rozvoji diabetes mellitus 2. typu. Nicméně i u normoglykemických jedinců bylo prokázáno, že inzulínová rezistence je asociována s vyšším rizikem koronární aterosklerózy (DeFronzo, 2010). I další studie prokázaly, že snížená citlivost tkání k inzulínu koreluje s výskytem subklinické aterosklerózy a kardiovaskulárních onemocnění u nediabetické populace nezávisle na přítomnosti rizikových faktorů aterosklerózy (Bornfeldt, Tabas, 2011; Gast et al., 2012). Inzulínová rezistence je hlavním mechanismem spojujícím všechny komponenty metabolického syndromu, který je definován jako přítomnost centrální obezity (obvod pasu  $\geq 94$  cm u mužů a  $\geq 80$  cm u žen) a alespoň 2 z následujících kritérií: hyperglykémie (lačná glykémie  $\geq 5,6$  mmol/l), snížená hladina HDL-cholesterolu ( $< 1,0$  mmol/l u mužů a  $< 1,3$  mmol/l u žen), zvýšená hladina triglyceridů ( $\geq 1,7$  mmol/l), zvýšená hodnota krevního tlaku ( $\geq 130/85$  bez antihypertenzní léčby) (Alberti et al., 2006). Diagnostická kritéria metabolického syndromu shrnuje Tabulka 2. Přestože se inzulínová rezistence pojí především s diabetem mellitem 2. typu, bývá přítomna i u diabetiků 1. typu (Cleland et al., 2013). Jedna ze subanalýz studie DCCT prokázala, že i u diabetiků 1. typu je vyšší inzulínová rezistence spojena se zvýšeným následným rizikem mikro a makrovaskulárních komplikací. V této analýze bylo prokázáno, že celková aplikovaná dávka inzulínu a přítomnost metabolického syndromu jsou u pacientů s diabetem mellitem 1. typu prediktory horší prognózy a rozvoje komplikací (Kilpatrick et al., 2017). Zdá se tedy, že nejen hyperglykémie ale i inzulínová rezistence jako taková mají úlohu v rozvoji vaskulárních komplikací.

<b>Tabulka 2: Diagnostická kritéria metabolického syndromu</b>	
<b>Centrální obezita</b>	obvod pasu $\geq 94$ cm u mužů
	$\geq 80$ cm u žen
<b>a 2 z následujících:</b>	
<b>Zvýšená hladina TAG</b>	$\geq 1.7$ mmol/l nebo
	léčená hypertriglyceridémie
<b>Snížená hladina HDL</b>	$< 1.0$ mmol/l u mužů
	$< 1.3$ mmol/l u žen
<b>Zvýšení krevního tlaku</b>	systolického: $\geq 130$ mmHg nebo
	diastolického: $\geq 85$ mmHg nebo
	léčená arteriální hypertenze
<b>Zvýšená lačná glykémie</b>	$\geq 5.6$ mmol/l nebo
	dříve diagnostikovaný diabetes mellitus 2. typu

Ačkoliv nebyly doposud molekulární mechanismy inzulínové rezistence plně pochopeny, byly popsány abnormality v inzulínové signalizaci (*Russell et al., 2006*). V periferních tkáních se za normálních podmínek zahajuje působení inzulínu navázáním na specifický receptor buněčné membrány - inzulínový receptor (IR). Vazba inzulínu na extracelulární podjednotku IR indukuje konformační změny, které způsobují dimerizaci sousedních receptorů a aktivaci tyrosinkinázové domény jeho intracelulární části. Aktivace tyrosinkinázy IR podporuje autofosforylaci samotné intracelulární části IR a celé řady proteinů, které se účastní intracelulární signalizace (signalizační proteiny inzulínového receptoru neboli IRS). Vazba inzulínu na IR reguluje intracelulárně dvě hlavní signalizační kaskády. První cesta je zprostředkována přes IRS-1/fosfatidylinositol-3-kinázovou dráhu a podílí se na regulaci metabolických dějů (vstup glukózy do buňky přes GLUT4 transportér, syntéza glykogenu, proteinů, inhibice lipolýzy). Druhá cesta vede k aktivaci Ras, Raf a mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK) a hraje roli v řízení růstových procesů, mitózy a diferenciaci. Zprostředkovává tak proliferační a prozánětlivý účinek inzulínu (*Madonna, De Caterina, 2012*). Zdá se, že regulace těchto dvou cest může být oddělena. Některá data naznačují, že regulace metabolické cesty je u inzulín-rezistentních jedinců snížena, zatímco aktivace růstových procesů je stacionární. Na in vitro modelech a u inzulín-rezistentních zvířat byla prokázána snížená aktivace „metabolické cesty“ přes IRS-1/PI-3-kinázovou dráhu, což vede k poklesu příjmu glukózy, snížené syntéze NO a snížené utilizaci glukózy v inzulín-senzitivních tkáních. Pokles v transportu glukózy je zaznamenán na úrovni beta buněk pankreatu s indukcí kompenzačního zvýšení sekrece inzulínu. Zároveň však zůstává aktivita MAPK a „růstová signalizační dráha“ neovlivněna (*Montagnani et al., 2002*). Inzulínová

rezistence a reaktivní hyperinzulinémie tak mohou vést k neadekvátní aktivaci proliferace a prozánětlivé reakci.

V cévní stěně hyperinzulinémie stimuluje proliferaci hladkých svalových buněk, produkci inhibitoru aktivátoru plazminogenu typu 1, endotelinu, prozánětlivých cytokinů a zvýšení exprese povrchových adhezivních molekul endotelových buněk (*Ridray, 1995; Golovchenko et al., 2000; Madonna et al., 2004*). Inzulínová rezistence podmiňuje dále endotelovou dysfunkci tím, že vede ke snížení syntézy NO s následným zvýšením cévního tonu a hypertenzi (*Montagnani et al., 2001*). Na zvířecích modelech bylo prokázáno, že hyperinzulinémie indukuje ztlušťování cévní stěny a tvorbu atheromových plátů (*Stout, 1990*). Inzulín je také růstový faktor schopný podporovat angiogenezi. Tento efekt hraje roli v neovaskularizaci sítnice a v patofyziologii diabetické mikroangiopatie (*Zunker, 1996*).

Inzulínová rezistence v jaterních buňkách vede k inadekvátní inhibici produkce glukózy a podmiňuje hyperglykémii. Zároveň dochází v hepatocytu k zvýšené produkci VLDL částic, což iniciuje sekvenci změn lipoproteinů se zvýšením hladin LDL a snížením hladin HDL částic cholesterolu (*Adiels, 2008*). Snížená inhibice lipolýzy vede ke zvýšení hladiny volných mastných kyselin v cirkulující krvi a jejich toku do jater a dalších tkání. Inzulínová rezistence v tukové tkáni podmiňuje vyšší tvorbu prozánětlivých cytokinů a adipokinů, které dále snižují citlivost tkání k inzulínu (*Knights, 2014*). Inzulínová rezistence v játrech a tukové tkáni tak vede k rozvoji dyslipidémie a prozánětlivému stavu, který podporuje rozvoj aterosklerotických komplikací.

### **3.2.3. Arteriální hypertenze**

Diabetes mellitus a arteriální hypertenze jsou běžná onemocnění, která často koexistují. Pacienti s diabetes mellitus trpí arteriální hypertenzí dvakrát častěji, než je tomu v obecné populaci (*Sampanis, Zamboulis, 2008*). Doposud nebyla zcela objasněna příčina rozvoje hypertenze u pacientů s diabetes mellitus, diskutovanými patofyziologickými příčinami jsou genetická predispozice, inzulínová rezistence, abnormality membránového transportu, alterace odpovědi po aktivaci adrenoreceptorů, zvýšená citlivost cévní stěny k sodíku a neurohumorálním změnám (*Bakris, 1995*).

U diabetiků 1. typu je rozvoj hypertenze vázán s mikroalbuminurií. U těchto diabetiků prokázala 24hodinová monitorace krevního tlaku vyšší krevní tlak v průběhu noci (*Lafferty et al., 2000*). Menší studie u adolescentních diabetiků 1. typu naznačuje, že vyšší hodnoty



krvního tlaku v průběhu noci předchází rozvoji mikroalbuminurie (*Lurbe et al., 2002*). U hypertenzních diabetiků 1. typu s diabetickou nefropatií bylo dále zjištěno, že se zvyšuje aktivita sodíko-vodíkového výměnného transportéru. Rozvoj diabetické nefropatie následně vede i k sekundárnímu zvýšení krevního tlaku (*Sowers et al., 2001*).

Byl prokázán vztah mezi neléčenou arteriální hypertenzí a vyššími hladinami plazmatického inzulinu (*El-Atat et al., 2003*). Zdá se, že u pacientů s diabetes mellitus 2. typu je přítomna genetická predispozice k inzulinové rezistenci a arteriální hypertenzi (*Grunfeld et al., 1994*). Kromě genetické predispozice vede k arteriální hypertenzi samotná inzulinová rezistence skrze alteraci výměny iontů na buněčné membráně, zvýšenou aktivitu systému sympatoadrenálního a renin-angiotenzin-aldosteronového (s retencí sodíku a následnou expanzí volumu). Diskutován je také možný vliv změněných signalizačních drah inzulinu (ve stavu inzulinové rezistence) na vazokonstrikci (*Sampanis, Zamboulis, 2008*).

Zdá se, že arteriální hypertenze akceleruje vývoj mikrovaskulárních komplikací, především diabetické retinopatie a nefropatie. Koexistence diabetes mellitus a arteriální hypertenze dvojnásobně zvyšuje riziko kardiovaskulárních příhod a úmrtí oproti populaci diabetiků bez hypertenze (*Stamler et al., 1993; Perk et al., 2012*).

### **3.2.4. Nadváha a obezita**

Obezita představuje v obecné populaci jednu z hlavních příčin zvýšené morbidity a mortality z důvodu vyšší incidence kardiovaskulárních onemocnění a malignit. Obezita (především abdominální) představuje jeden z hlavních rizikových faktorů aterosklerózy. Množství viscerálního tuku koreluje s inzulinovou rezistencí a zvýšeným rizikem rozvoje diabetes mellitus 2. typu (*Kuwahara et al., 2017*). Viscerální obezita vede k metabolickým a oběhovým změnám skrze zvýšený tok volných mastných kyselin játry, který zvyšuje inzulinovou rezistenci a syntézu lipoproteinů. Pozorovány jsou vyšší hladiny a větší objem molekul VLDL, vyšší produkce menších denzních molekul LDL a snížené hladiny HDL (*Golay, Ybarra, 2005*). Zároveň zvýšená produkce adipocitokinů (např. leptinu) a prozánětlivého faktoru TNF $\alpha$  zhoršuje inzulinovou rezistenci a hypertenzi (*Serrano, 1998*). Obezita se pojí zejména s diabetem mellitem 2. typu, kolem 90% nově diagnostikovaných diabetiků 2. typu trpí obezitou (*Jung, 1997*). Nicméně i u pacientů s diabetem mellitem 1. typu dochází v posledních letech k výraznému zvýšení prevalence obezity. Nadváhou či obezitou trpí přibližně pětina mladých diabetiků 1. typu. Obezita u diabetiků 1. typu přispívá

k inzulinové rezistenci, dyslipidémii a kardiovaskulárním komplikacím (*Corbin et al., 2018*). Plně vyjádřený syndrom inzulinové rezistence „metabolický syndrom“ je přítomen u 10 % diabetiků 1. typu (*Pambianco et al., 2007*). Koexistence metabolického syndromu a diabetu mellitu 1. typu je spojena s vyšším rizikem vaskulárních komplikací (*Purnell et al., 2013*).

### **3.2.5. Dyslipidémie**

U pacientů s diabetes mellitus nalézáme zvýšené sérové hladiny triglyceridů a pokles hladiny HDL-cholesterolu. Narozdíl od diabetiků 1. typu není lipoproteinémie u diabetiků 2. typu obvykle plně korigována navozením normoglykémie, ale přetrvává dlouhodobě.

U diabetiků 2. typu hraje hlavní roli v rozvoji dyslipidémie inzulinová rezistence. Nedostatečná suprese lipolýzy vede k vyššímu uvolnění mastných kyselin z tukové tkáně, vyšší influx mastných kyselin do jater vede ke zvýšení produkce VLDL molekul s následným vzestupem hladiny triglyceridů a poklesem HDL cholesterolu. Patrně je také zvýšené množství malých denzních částic LDL (*Goldberg, 2001*).

In vitro studie naznačují, že lipoproteiny bohaté na triglyceridy mají proaterogenní vliv. Lipoproteiny bohaté na triglyceridy působí prozánětlivě a indukují apoptózu endoteliálních buněk (*Shin et al., 2004*). V makrofázích vedou k akumulaci lipidů a zvyšují expresi receptoru TNF $\alpha$  a adhezivních molekul, což vede ke zvýšené adhezi makrofágů k endotelovým buňkám (*Ting et al., 2007*).

Pacienti s diabetem mellitem nemusí mít významně zvýšené hladiny LDL cholesterolu, pro pacienty s diabetem mellitem 2. typu je však typické hromadění malých denzních částic LDL. Vzhledem k tomu, že každá částice LDL obsahuje jednu molekulu apolipoproteinu B, stanovení hladiny apolipoproteinu B může sloužit jako marker přítomnosti malých denzních LDL molekul v oběhu (*Mazzone et al., 2008*). In vitro bylo prokázáno, že malé částice LDL rychle vstupují do arteriální stěny, snadněji oxidují a mohou poškozovat endotelové buňky. Indukují také vyšší produkci prokoagulačních faktorů a interagují s proteoglykany cévní stěny (*Gardner et al., 1996; Sniderman, 2001*). Subendoteliální akumulace lipoproteinů aktivuje makrofágy, které produkují prozánětlivé faktory, stimulují migraci hladkosvalových buněk do cévní stěny a urychlují aterosogenezi (*Mazzone et al., 2008*). Stav je dále zhoršován nízkou hladinou HDL cholesterolu a s tím spojenou sníženou schopností transportu cholesterolu z buněk periferních tkání.

### **3.2.6. Kouření**

Kouření cigaret je dobře známý rizikový faktor aterosklerózy. U diabetiků 1. i 2. typu zvyšuje riziko mikrovaskulárních i makrovaskulárních komplikací. Kouření cigaret zvyšuje inzulínovou rezistenci a oxidační stres, indukuje endotelovou dysfunkci a působí prozánětlivě (*Eliasson, 2003; Ambrose, Barua, 2004*).

### 3.3.Diabetická autonomní neuropatie

Diabetická autonomní neuropatie (DAN) je definována jako porucha funkce periferního autonomního nervového systému u pacientů s diabetes mellitus. Velké studie ukazují, že postihuje až 40% diabetických pacientů (Ziegler, 2001). V České republice žije momentálně více jak 860 000 pacientů s diabetes mellitus (Data o diabetu v ČR, 2014), znamená to tedy, že více jak 340 000 Čechů nejspíše trpí touto sekundární neuropatií.

Autonomní nervový systém je zodpovědný za regulaci celé řady orgánových systémů. Symptomatologie poruch funkce periferních autonomních nervů bývá tudíž velmi rozmanitá, jak ukazuje Tabulka 3.

**Tabulka 3: Souhrn poruch orgánových systémů při diabetické autonomní neuropatii**

<b>Kardiovaskulární systém</b>	<b>Gastrointestinální systém</b>
klidová tachykardie	porucha motility jícnu
snížení variability srdeční frekvence při zátěži	diabetická gastroparéza
prodloužení QT intervalu	diabetická enteropatie (průjem / zácpa)
arteriální hypertenze	inkontinence stolice
ztráta diurnální variability krevního tlaku, "non-dipping"	
ortostatická hypotenze	<b>Urogenitální trakt</b>
	dysfunkce močového měchýře (retence / inkontinence)
postprandiální hypotenze	erektilní dysfunkce
hypertrofie levé komory srdeční	retrográdní ejakulace
systolická a diastolická dysfunkce	
tichá myokardiální ischemie	<b>Sudomotorický systém</b>
snížená adaptace na změny teploty	anhidróza dolní poloviny těla
intolerance zátěže	hyperhidróza horní poloviny těla
zvýšená tuhost cév	
<b>Endokrinní systém</b>	<b>Oči</b>
porucha vnímání hypoglykémie	porucha adaptace zornice na snížený osvět (mióza ve tmě)

### **3.3.1. Patogeneze diabetické autonomní neuropatie**

Etiopatogeneze diabetické neuropatie je komplexní, multifaktoriální a zatím ne zcela objasněna. Dlouhodobá hyperglykémie je považována za hlavní příčinu mikro i makrovaskulárních komplikací diabetes mellitus. Předpokládá se neuroischemické poškození v důsledku endotelové dysfunkce a strukturálních změn vasa nervorum, přímé neuronální poškození indukované hyperglykemií, dalšími diskutovanými mechanizmy jsou autoimunitní procesy a deficit neurohumorálního růstového faktoru (*Yasuda et al., 2003; Vinik et al., 2003; Dimitropoulos, 2014*).

Mezi nezávislé rizikové faktory pro vznik diabetické neuropatie patří kromě hyperglykémie a hladiny glykovaného hemoglobinu věk, trvání diabetu, BMI, kouření, hypercholesterolémie a hypertriglyceridémie, arteriální hypertenze a incidence ostatních mikrovaskulárních komplikací (*Rabinowe et al., 1990; Dafaalla et al., 2016*).

Dalším diskutovaným mechanismem je role autoimunity u diabetické neuropatie. Několik studií prokázalo nezávislou asociaci přítomnosti nervových tkáňových protilátek a diabetické neuropatie u pacientů s diabetem mellitem 1. typu (*Maser, 1990; Ejsskjaer et al., 1999; Vinik et al., 1995*). Jedna menší práce prokázala korelaci přítomnosti cirkulujících sulfatidových a fosfolipidových protilátek s diabetickou neuropatií i u diabetiků 2. typu (*Politi et al., 2016*).

Vliv má i genetická predispozice jedince. Bylo zjištěno, že celá řada genů má vztah k vývoji nebo progresi diabetické neuropatie. Genové polymorfizmy spojené s autonomní dysfunkcí kódují například antioxidační enzym (glutathion S-transferázu), transkripční faktor (TCF7L2) nebo receptor autonomního nervového systému (alfa2B-adrenergní receptor) (*Sivenius et al., 2003; Vojtková et al., 2013; Ciccacci et al., 2013*).

### **3.3.2. Kardiální autonomní neuropatie**

Nejzávažnějším a nejčastěji vyšetřovaným typem diabetické autonomní neuropatie je kardiální autonomní neuropatie (KAN). Autonomní nervový systém ovlivňuje cestou sympatiku a parasympatiku každý orgán lidského těla. Hraje zásadní roli v regulaci vitálních funkcí, ovlivňuje srdeční frekvenci, krevní tlak, kontraktilitu srdečního svalu, čímž udržuje stabilitu kardiovaskulárního systému (*Vinik et al., 2003*). Nepřekvapí tedy, že se KAN ukázala jako významný faktor kardiovaskulární morbidita a mortality. Diagnóza KAN je

asociována s 5ti-násobným zvýšením mortality diabetika, vyšší prevalencí němé myokardiální ischemie, systolickou a diastolickou dysfunkcí levé komory srdeční při absenci významného aterosklerotického postižení koronárních tepen (Maser, 1990; Vinik et al., 2007; Guo et al., 2017). Pacienti s KAN mají zvýšené riziko s anestezií spojených komplikací, vyšší peroperační morbiditu i mortalitu (Huang, 2006; Oakley, 2011). Důležité je také, že horší kardiovaskulární prognózu mají i pacienti v subklinických fázích KAN (Vinik et al., 2003; Spallone et al., 2011).

### **Symptomy**

Neboť je poškození nervových vláken závislé na jeho délce, predominantně bývají poškozena vlákna nervus vagus. Časná stadia KAN se proto projevují zrušením tlumivého účinku n. vagus na kardiovaskulární systém. Jedním z prvních symptomů, které můžeme u diabetiků s KAN zaznamenat, je klidová tachykardie. Dalším nežádoucím efektem je v důsledku relativní hyperaktivity sympatiku vyšší sklon k arteriální hypertenzi a nedostatečný pokles krevního tlaku v nočních hodinách tzv. "non-dipping". V pozdějších stádiích KAN dochází k výraznějšímu poškození i sympatických nervových vláken. Narušena je tak funkce regulace cévního tonu a dochází k celkové nestabilitě kardiovaskulárního systému. Pacienti proto trpí únavou již po malém stupni zátěže, stěžují si na nevykonnost, pocity na omdlení či kolapsové stavy v důsledku posturální či postprandiální hypotenze (Malá et al., 2015).

### **Diagnostika**

K hodnocení funkce kardiovaskulárního autonomního systému se dá využít celá řada testů s vysokou senzitivitou i specificitou (test citlivosti baroreflexů, stanovení hladiny plazmatických katecholaminů, zobrazení kardiální adrenergní inervace pomocí  $^{123}\text{I}$ -MIBG) (Spallone et al., 2011). Tyto metody jsou však v běžné praxi drahé a špatně dostupné. Zlatým standardem se proto stalo hodnocení variability srdeční frekvence při kardiovaskulárních autonomních reflexních testech. Tato metoda využívá detekce změn vzdálenosti R-R intervalů v testu ortostatickém, hlubokého dýchání a Valsalvova manévru. Patologie těchto parametrů svědčí zejména o poruše funkce parasympatiku. Hodnocen je dále pokles systolického krevního tlaku v ortostáze, který vypovídá o postižení funkce sympatiku. Doplnující informaci o rozložení aktivity sympatiku a parasympatiku může poskytnout spektrální analýza variability srdeční frekvence, která je prováděna v průběhu ortostatického testu. Neboť variabilita srdeční frekvence klesá s věkem pacienta, k hodnocení jednotlivých parametrů je nutno využít věkově závislých norem. Důležité je mít na paměti, že vyšetřit variabilitu srdeční

frekvence lze pouze v případě fyziologického sinusového rytmu. Pacient by neměl prodělat v posledním týdnu před vyšetřením těžkou hypoglykémii, interkurentní onemocnění, alespoň 24 hodin před vyšetřením by neměl pít alkohol, kouřit a užívat léky, které největší měrou ovlivňují autonomní nervový systém (diuretika, beta-blokátory, antidepresiva) (*Malá et al., 2017*).

### **Terapie**

Základem terapie diabetické autonomní neuropatie je dosažení optimální kompenzace diabetes mellitus. U diabetiků s nadváhou lze dosáhnout zlepšení parametrů kardiovaskulárních testů redukcí váhy a zvýšením aerobní tělesné zátěže (*Maser, Lenhard, 2007*). Vzhledem k tomu, že mezi rizikové faktory rozvoje KAN patří arteriální hypertenze a dyslipidémie, měla by být adekvátně léčena i tato onemocnění. Z léků má efekt na zlepšení parametrů autonomních funkcí podávání antioxidačně působící kyseliny thioktové (*Spallone et al., 2011*). Ostatní léčba je čistě symptomatická (podávání beta-blokátorů v případě klidové tachykardie, režimová opatření a případné nasazení midodrinu či fludrokortizonu při těžké ortostatické hypotenzi).

## **3.4. Ateroskleróza a diabetes mellitus**

Ateroskleróza je chronické progresivní onemocnění charakterizované akumulací lipidů, krevních složek a fibrózní tkáně v cévní stěně. Věk, diabetes mellitus, vysoká hladina celkového cholesterolu a LDL, nízká hladina HDL, arteriální hypertenze, kouření tabáku, obezita a neaktivní životní styl jsou nyní považovány za hlavní rizikové faktory aterosklerózy (*Rafieian-Kopaei et al., 2014*).

Kardiovaskulární onemocnění podmíněná aterosklerózou představují hlavní příčinu mortality diabetických pacientů (přibližně 70% diabetiků zemře v důsledku kardiovaskulární příhody) (*Laakso, Kuusisto, 2014; De Ferranti et al., 2014*). Makrovaskulární komplikace diabetes mellitus jsou podmíněny aterosklerotickým postižením středně velkých a velkých (elastických a muskulárních) tepen diabetika. Nejvýznamnější je postižení tepen koronárních (ischemická choroba srdeční), mozkových (ischemické cévní mozkové příhody) a tepen dolních končetin (ischemická choroba dolních končetin). Morfologicky se aterosklerotické změny cév diabetika neliší od nediabetické populace, výskyt je však 2-4krát častější,

aterosklerotický proces je difúznější a postihuje i menší cévy, vzniká v mladším věku, progreduje rychleji a ženy bývají postiženy stejně často jako muži (premenopauzální diabetičky nejsou chráněny před rozvojem aterosklerózy jak je tomu u nediabetické populace) (Pelikánová, Válek, 2011, s. 450).

Za hlavní faktor progresu aterosklerózy u diabetických pacientů je považováno dlouhodobé zvýšení glykémie. Hyperglykémie vede k celé řadě změn cévní tkáně na buněčné úrovni, které urychlují aterosklerotický proces. Neenzymová glykace proteinů a lipidů alteruje jejich funkci narušením molekulární konformace, změnou enzymatické aktivity, snížením schopnosti degradace a odlišnou vazbou k receptorům. Glykosylované proteiny interagují se specifickými receptory endotelových buněk, makrofágů i myocytů a ovlivňují tak všechny buňky, které se účastní procesu aterosklerózy. Interakce glykosylovaných proteinů s příslušnými receptory vede k indukci oxidačního stresu, prozánětlivé reakci, aktivaci proteinkinázy C a následné změně exprese růstových faktorů. Všechny zmíněné mechanismy mohou být navíc vzájemně provázány (Aronson, Rayfield, 2002). Samotná hyperglykémie podporuje produkci prozánětlivých cytokinů jako jsou C-reaktivní protein (CRP), tumor necrosis factor alfa a interleukin 6 (IL-6), které dále hrají významnou úlohu v progresi diabetické aterosklerózy (Beckman et al., 2002). V terénu hyperglykémie byla rovněž na animálních modelech prokázána zvýšená aktivace lipoxigenáz spojená se zvýšenou tvorbou oxidovaných lipidů a eikosanoidů. Generovaný oxidační stres následně působí výrazně proaterogenně (Natarajan, 2002).

Konvenční rizikové faktory aterosklerózy jako jsou arteriální hypertenze, dyslipidémie, obezita a kouření dále kardiovaskulární riziko u diabetiků zvyšují (Snell-Bergeon, Nadeau, 2012). Zásadní roli v akceleraci aterosklerózy hraje také inzulinová rezistence a s ní spojený komplex metabolických abnormalit, který již u pacientů s prediabetem vede k rozvoji aterosklerotických koronárních změn (Haffner et al., 2000).

### **3.4.1. Vztah kardiální autonomní neuropatie a aterosklerózy**

V posledních letech bylo odpublikováno několik menších prací zabývajících se vazbou KAN a aterosklerotického postižení cév u pacientů s diabetem mellitem 2. typu. Dle jejich výsledků se zdá, že snížená variabilita srdeční frekvence koreluje u diabetiků 2. typu s výskytem ischemické choroby dolních končetin, tloušťkou karotické intimy i kalcifikací koronárních tepen (Fakhrzadeh et al., 2012; Jung et al., 2013; Canani et al., 2013). Snížení



variability srdeční frekvence je u diabetiků 2. typu detekovatelné již časně od diagnózy onemocnění a předchází klinickým projevům kardiovaskulárních aterosklerotických komplikací (*Canani et al., 2013*). Navíc dle výsledků 3-leté longitudinální studie Gottsätera a kol. nižší variabilita srdeční frekvence nejenom koreluje s tloušťkou karotické intimy, ale dokonce predikuje progresi tloušťky aterosklerotických plátů do budoucna (*Gottsäter et al., 2006*). Autoři proto ve svých pracích diskutují význam časné diagnostiky a dlouhodobého sledování autonomní neuropatie jako prediktoru budoucí progresy aterosklerózy u diabetiků 2. typu s cílem časně intervenovat a předejít či alespoň zpomalit průběh kardiovaskulárních komplikací (*Canani et al., 2013; Gottsäter et al., 2006*).

I u pacientů s diabetem mellitem 1. typu byla nalezena korelace snížení variability srdeční frekvence a progresy kalcifikace koronárních tepen jako významného markeru rizika kardiovaskulárních onemocnění. Práce Rodrigueze a kol. prokázala na kohortě 652 diabetiků 1. typu negativní asociaci variability srdeční frekvence a kalcifikací koronárních tepen nezávisle na BMI, glykovaném hemoglobinu, lipidovém profilu, užívání statinů i léků ovlivňujících renin-angiotenzin-aldosteronový systém (*Rodrigues et al., 2010*).

Patofyziologický mechanismus vazby snížení variability srdeční frekvence (ukazatele kardiální autonomní neuropatie) a markerů aterosklerózy nebyl doposud zcela vysvětlen. Aterosklerotické změny vasa nervorum mohou vést k ischemii nervových vláken a neuropatii ještě před projevy postižení větších tepen. Na druhou stranu již časně stadium KAN může přispívat k rozvoji aterosklerózy skrze zvýšení tuhosti tepen a krevního tlaku při poruše tlumivého účinku nervus vagus (*Spallone et al., 2001; Liatis et al., 2011; Bagherzadeh et al., 2013*).

## **4. Hypotézy práce**

1. Existuje vazba mezi přítomností kardiální autonomní neuropatie a vyšší intimomediální šířkou karotických tepen u pacientů s diabetes mellitus 1. typu.
2. Existuje vazba mezi přítomností kardiální autonomní neuropatie a vyšší intimomediální šířkou karotických tepen u pacientů s diabetes mellitus 2. typu.
3. Rekurentní analýza variability srdeční frekvence je metoda, kterou lze použít k hodnocení autonomní dysfunkce u pacientů s vazovagálními synkopami.
4. Rekurentní analýza variability srdeční frekvence je metoda, kterou lze použít k hodnocení autonomní dysfunkce u pacientů s diabetickou autonomní neuropatií.

## **5. Cíle výzkumu**

Primárním cílem výzkumu bylo objasnit vztah metabolických faktorů, autonomní neuropatie a aterosklerotického poškození karotických tepen u pacientů s diabetem mellitem 1. a 2. typu.

Sekundárním cílem výzkumu bylo zhodnotit, zda je možné využít rekurentní analýzu variability srdeční frekvence k diagnostice autonomní dysfunkce.

## **6. Vztah kardiální autonomní neuropatie a aterosklerotického postižení karotických tepen u pacientů s diabetes mellitus 1. a 2. typu (řešení hypotézy 1 a 2)**

### **6.1. Metodika**

#### ***6.1.1. Studovaná skupina***

Vyšetřili jsme soubor dospělých pacientů s diabetem mellitem 1. a 2. typu a nediabetických kontrol, kteří byli schopni a ochotni zúčastnit se studie. Všichni probandi byli vyšetřeni v letech 2015-2017. K účasti na studii jsme oslovili diabetiky, kteří byli již několik let dispenzarizováni diabetologickou ambulancí Fakultní nemocnice v Motole (FN Motol). Zaměřili jsme se především na diabetiky 1. a 2. typu, u kterých se dal předpokládat výskyt kardiální autonomní neuropatie (přítomnost klidové tachykardie, diabetické neuropatie, trvání diabetes mellitus 5 let a déle). Kontrolní skupina pacientů se skládala ze zdravých dobrovolníků bez diabetes mellitus, thyreopatie či anamnesticky známé nediabetické neuropatie. Do studie nebyli zařazováni pacienti s anamnézou nádorového onemocnění, ischemické choroby srdeční a jedinci s akutním infekčním onemocněním.

Každý účastník studie byl pečlivě obeznámen se všemi plánovanými vyšetřeními a účelem studie a svůj souhlas s účastí ve studii potvrdil podpisem informovaného souhlasu. Studie byla schválena Etickou komisí FN Motol.

#### ***6.1.2. Obecné vyšetření a zhodnocení mikrovaskulárních komplikací***

Anamnestická data byla získána formou řízeného rozhovoru s pacientem. Zaměřovali jsme se na zjištění typu diabetu, jeho trvání, přítomnosti diabetických komplikací, přítomnost a léčbu rizikových faktorů aterosklerózy jako je hypertenze, dyslipidémie, kouření. Současní a bývalí kuřáci a kuřačky byly zařazeny do skupiny kuřáků.

Provedli jsme základní antropometrické měření a fyzikální vyšetření. Údaj o tělesné výšce byl získán anamnesticky, v případě neznalosti byla výška zjištěna měřením. Tělesná hmotnost byla stanovena změřením na kalibrované váze. Index tělesné hmotnosti (BMI) byl vypočten jako váha v kg dělená čtvercem výšky v metrech. Krevní tlak byl měřen kalibrovaným

tonometrem po 10ti minutách v klidu vleže, zaznamenána byla střední hodnota vypočtená ze 2 měření na obou horních končetinách.

Každému probandovi byly odebrány za standardních podmínek nalačno krevní vzorky. V certifikované hematologické a biochemické laboratoři FN Motol byly stanoveny následující parametry: krevní obraz, hladiny iontů (Na, K, Cl), hladina urey a kreatininu (včetně výpočtu glomerulární filtrace pomocí MDRD vzorce), hladina glykémie, glykovaný hemoglobin HbA1c, hladina triglyceridů, celkového, HDL a LDL cholesterolu, výpočet aterogenního indexu (AI) jako poměru celkového a HDL cholesterolu ( $AI = \text{celkový cholesterol} / \text{HDL cholesterol}$ ), hladina thyreoidey stimulujícího hormonu (TSH) a volné frakce thyroxinu (fT4), hladina albuminu a celkové bílkoviny.

Kromě odebrání anamnézy mikrovaskulárních komplikací, byli všichni probandi i screeningově vyšetřeni. Všichni pacienti s diabetes mellitus absolvovali v posledních 12ti měsících před zařazením do studie oftalmologické vyšetření k určení přítomnosti diabetické retinopatie. Byla zjišťována přítomnost mikroalbuminurie (MAU) z ranní moči (poměr albumin/kreatinin vyšší než 2,5 mg/mmol). Přítomnost periferní sensorimotorické neuropatie byla vyšetřována podle doporučení České diabetologické společnosti (*Lacigová et al., 2016*). K testování taktilního čítí bylo použito 10g nylonové Semmes-Weinsteinovo monofilamentum, prahy vibračního čítí byly určeny kalibrovaným biothesiometrem. Neuropatie tenkých termických nervových vláken byla vyhodnocena kvantitativním testováním tepelných prahů za použití normativních dat pro českou populaci (*Buršová et al., 2012*).

### **6.1.3. Vyšetření kardiální autonomní neuropatie**

Všichni probandi byli vyšetřeni na přítomnost kardiální autonomní neuropatie v Neurofyzilogické laboratoři FN Motol. Využívána byla metoda vyhodnocení variability srdeční frekvence (HRV) podle doporučení Evropské Kardiologické společnosti (*Malik et al., 1996*). Vyšetření bylo provedeno za standardizovaných podmínek (v klidné místnosti, mezi 7. a 12. hodinou dopoledne, nalačno či 2 hodiny od posledního jídla, za splnění podmínek absence akutní infekce a hypoglykémie, 24-hodinové vysazení beta-blokátorů, antidepresiv a diuretik) zařízením FAN (výrobce Schwarzer, Německo). Byly vyhodnocovány 4 parametry kardiovaskulárních autonomních reflexních testů a 3 parametry spektrální analýzy variability srdeční frekvence. Prováděn byl test hlubokého dýchání s kontrolovanou frekvencí 6 dechů za

minutu, v němž byl sledován parametr E:I ratio. Dále byl prováděn test Valsalvova manévru proti definovanému odporu vzduchu 40mmHg, ve kterém bylo vyhodnocováno Valsalva ratio. Z průběhu testu ortostatického (5 minut leh, 5 minut stoj) byly získány parametry Ewing 30:15 a ortostatický pokles systolického krevního tlaku. Výše zmíněné parametry byly srovnávány s věkově závislými normami (*Lacigová et al., 2016*). V rámci spektrální analýzy variability srdeční frekvence byly vyhodnocovány parametry spektrálních výkonů nízkých frekvencí (LF), vysokých frekvencí (HF) a celkový spektrální výkon (TP). Získané hodnoty spektrálních výkonů během ortostatického testu byly srovnávány s normativními daty pro českou populaci (*Vlčková et al., 2010*). Přítomnost kardiální autonomní neuropatie byla určena při patologii 2 a více stanovovaných parametrů.

#### **6.1.4. Vyšetření karotických tepen**

K zhodnocení aterosklerotického postižení karotických tepen bylo použito sonografické měření intimomediální šíře (IMT). Vyšetření bylo prováděno jedním zkušeným angiologem za pomoci ultrazvukového přístroje Toshiba Nemio MX s lineární Toshiba PLN-805AT ultrazvukovou sondou (frekvenční rozsah 6,0 až 12,0 MHz). Zaznamenávány byly hodnoty IMT arteria carotis communis (CCA) ve vzdálenosti 1 cm od karotického bulbu měřené na vzdálenější stěně tepny. Pro statistickou analýzu byla vypočtena průměrná hodnota ze dvou měření na obou stranách.

#### **6.1.5. Statistická analýza**

Pro statistickou analýzu byl použit model semiparametrické logistické regrese ze třídy zobecněných aditivních modelů (GAM). Tato metoda byla použita jako zobecnění standardní vícenásobné regrese s cílem vyrovnat se s binární povahou odezvy a potenciálně nelineárními efekty některých vysvětlujících proměnných. Potenciálně nelineární vztahy byly modelovány pomocí penalizovaných splinů. Za statisticky významné bylo považováno  $p < 0,05$ .

## 6.2. Výsledky

### 6.2.1. Studovaná skupina

Celkem bylo vyšetřeno 49 pacientů s diabetes mellitus 1. typu, 26 pacientů s diabetes mellitus 2. typu a 48 nediabetických kontrol. Ze skupiny kontrol jsme museli vyřadit 3 probandy z důvodu přítomnosti nediabetické periferní neuropatie. Hodnoceny byly tedy nálezy u 45 nediabetických subjektů. Žádný proband netrpěl ischemickou chorobou srdeční a neprodělal nádorové onemocnění. Z důvodu autoimunitní tyreoiditidy užívalo 26 diabetiků 1. typu (53%) a 6 diabetiků 2. typu (23%) substituci levothyroxinem. Všechny studované subjekty měly v době testování normální hodnoty TSH a výživových parametrů.

Diabetickou retinopatií trpělo 32 pacientů s diabetes mellitus 1. typu (65%) a 13 pacientů s diabetes mellitus 2. typu (50%). Diabetickou nefropatii mělo prokázáno 20 diabetiků 1. typu (41%) a 11 diabetiků 2. typu (42%).

Kardiální autonomní neuropatie byla diagnostikována u 22 pacientů s diabetes mellitus 1. typu (45%), 11 pacientů s diabetes mellitus 2. typu (42%). Všechny nediabetické subjekty měly normální výsledky kardiovaskulárních autonomních reflexních testů.

Souhrn základních charakteristik a nejvýznamnějších laboratorních výsledků je shrnut v Tabulce 4.

**Tabulka 4 - Základní charakteristiky studované skupiny**

	Pacienti s DM1 (n=49)		Pacienti s DM2 (n=26)		Subjekty bez DM (n=45)	
	KAN prokázána (n=22)	KAN neprokázána (n=27)	KAN prokázána (n=11)	KAN neprokázána (n=15)		
Pohlaví - žena/muž	10/12	15/12	6/5	6/9	28/17	
Nikotinismus - ano/ne	12/10	7/20	6/5	6/9	12/33	
Věk	46 (10)	45 (15)	60 (8)	64 (9)	54 (11)	roky
Délka trvání DM	29 (12)	23 (12)	18 (9)	13 (7)		roky
Diabetická retinopatie - ano/ne	19/3	13/14	7/4	6/9		
Diabetická nefropatie - ano/ne	13/9	7/20	7/4	4/11		
Diabetická neuropatie končetin - ano/ne	22/0	17/10	11/0	12/3		
BMI	26,1 (4,2)	26,5 (7,9)	32,8 (4,1)	32,4 (4,1)	26,8 (4,3)	kg/m <sup>2</sup>
systolický krevní tlak	135 (19)	130 (13)	144 (18)	136 (13)	127 (14)	mmHg
diastolický krevní tlak	79 (9)	74 (7)	82 (10)	75 (8)	76 (7)	mmHg
HbA1C	71 (16)	70 (17)	70 (18)	69 (23)	38 (3)	mmol/mol
celkový cholesterol	4,4 (0,8)	4,8 (1,0)	4,4 (1,4)	4,4 (1,1)	5,4 (1,0)	mmol/l
HDL	1,3 (0,3)	1,5 (0,5)	1,0 (0,2)	1,0 (0,3)	1,5 (0,4)	mmol/l
LDL	2,4 (0,7)	2,6 (0,8)	2,3 (0,7)	2,4 (0,7)	3,1 (0,9)	mmol/l
TAG	1,3 (0,8)	1,1 (0,5)	2,8 (2,5)	2,5 (2,8)	1,3 (0,6)	mmol/l
<b>IMT</b>	<b>0,88 (0,29)</b>	<b>0,73 (0,18)</b>	<b>0,98 (0,16)</b>	<b>1,02 (0,35)</b>	<b>0,73 (0,15)</b>	<b>mm</b>
TSH	1,57 (1,07)	1,64 (1,13)	1,59 (0,51)	1,14 (0,73)	2,33 (1,18)	mIU/l

Průměrná hodnota (směrodatná odchylka)

## **6.2.2. Statistické modely**

### **6.2.2.1. Všechna data (nediabetici, diabetici 1. a 2. typu)**

První semiparametrické regresní modely byly vypočítávány ze všech dostupných dat zahrnujících subjekty zdravé, s diabetem mellitem 1. i 2. typu. Za závisle proměnnou byla označena průměrná hodnota intimomediální šíře karotid (IMT).

#### 6.2.2.1.1. Základní model

V základním modelování byl hodnocen efekt přítomnosti kardiální autonomní neuropatie (KAN), přítomnosti diabetes mellitus (bez rozlišení typu) a korekce na věk a body mass index (BMI). Korekce na věk a BMI jsou obecné (hladké) funkce, z modelových odhadů je tedy vidět, jak výrazně je jejich efekt nelineární.

Statisticky významná byla v tomto modelu přítomnost KAN ( $p=0,00309$ ), diabetes mellitus ( $p=0,01324$ ), BMI ( $p=0,00299$ ) i věku ( $p<0,00001$ ). Vliv věku byl v tomto modelu nelineární (zesiloval pro vyšší věkové skupiny), vliv BMI nebyl nelineární.

#### 6.2.2.1.2. Základní model s rozlišením typu diabetu

V druhém modelu byl taktéž hodnocen efekt přítomnosti kardiální autonomní neuropatie (KAN), korekce na věk a body mass index (BMI), faktor přítomnosti diabetes mellitus byl v tomto modelu rozlišen do 3 skupin - skupina s diabetes mellitus 1. typu (DM1), skupina s diabetes mellitus 2. typu (DM2) a skupina bez diabetes mellitus.

Statisticky významná byla v tomto modelu přítomnost KAN ( $p=0,00325$ ), BMI ( $p=0,00640$ ), věku ( $p<0,00001$ ) a diabetes mellitus 1. typu ( $p=0,02456$ ). Hodnoty IMT byly u pacientů s diabetem mellitem 2. typu po korekci k BMI, věku a přítomnosti KAN obecně vyšší, avšak na hranici statistické významnosti ( $p=0,06259$ ). V tomto modelu byl taktéž efekt věku nelineární, vliv BMI nelineární nebyl.



#### 6.2.2.1.3. Základní model zaměřený na interakci přítomnosti KAN a DM

Tento model zjišťoval, zda některá z 6 kombinací statusu přítomnosti či nepřítomnosti diabetes mellitus (DM) a kardiální autonomní neuropatie (KAN) je výrazně odlišná oproti tomu, co je dáno pouze součtem efektů DM a KAN (tedy toho, co je zobrazeno v předchozím modelu 6.2.2.1.2).

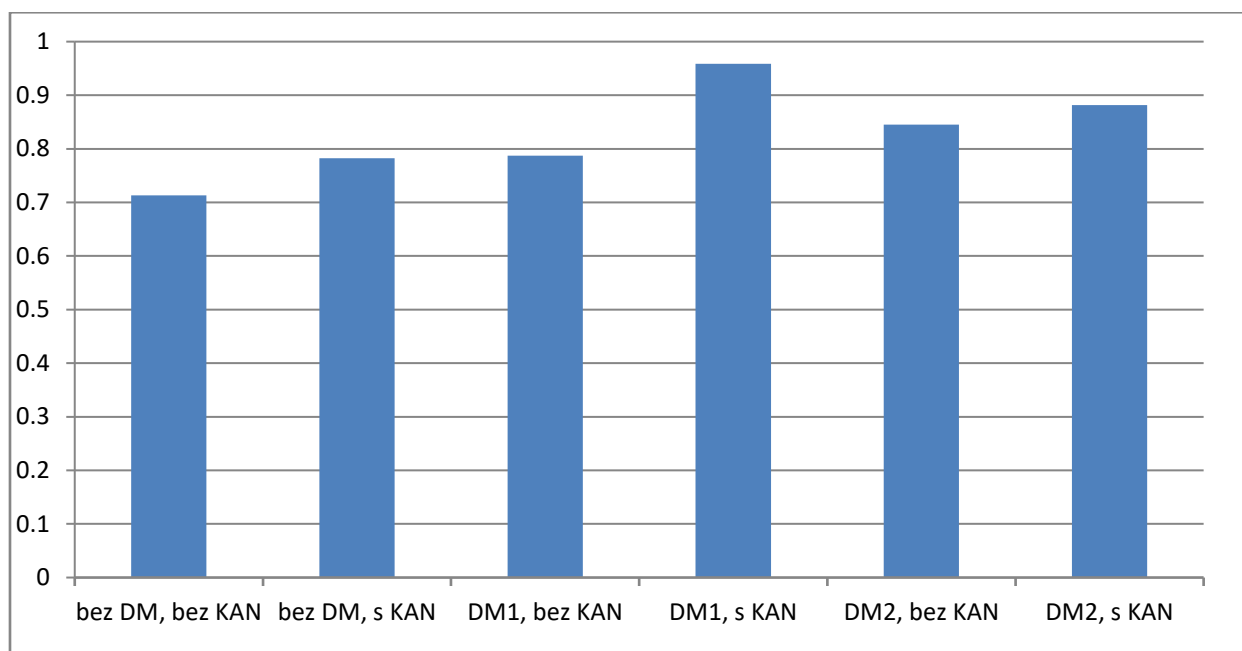
V tomto modelu byla prokázána interakce efektů přítomnosti DM a KAN na intimomediální šíři karotid ( $p=0,00363$ ).

Průměrné hodnoty IMT odhadované z modelu pro 6 kombinací statusu DM a KAN jsou uvedeny v Tabulce 5 a Grafu 1.

Tabulka 5 - Průměry IMT odhadované z modelu pro 6 kombinací DM a KAN statusu

DM (0-bez DM, 1-DM 1.typu, 2-DM 2.typu)	KAN (0-bez KAN, 1-s KAN)	Průměr IMT odhadnutý z modelu (mm)	Střední chyba odhadnutá z modelu
0	0	0.7131	0.0342
0	1	0.7823	0.0438
1	0	0.7870	0.0433
1	1	0.9586	0.0440
2	0	0.8454	0.0557
2	1	0.8816	0.0607

Graf 1 - Průměry IMT (mm) odhadované z modelu pro 6 kombinací DM a KAN statusu



#### 6.2.2.1.4. Základní model zaměřený na interakce přítomnosti KAN a DM, KAN a věku, KAN a BMI

Tento model je dalším rozšířením modelu předchozího. Studuje nejen změny efektu přítomnosti DM a KAN, ale umožňuje sledovat změny efektu přítomnosti KAN s věkem a BMI.

I v tomto modelu byla prokázána interakce efektů přítomnosti DM a KAN na šířku karotické intimy ( $p=0,00001$ ). Tento model odhalil nově také interakce KAN s věkem ( $p=0,00768$ ) a KAN s BMI ( $p=0,01427$ ). V KAN pozitivních skupinách byl nárůst IMT s věkem a zvyšujícím se BMI rychlejší.

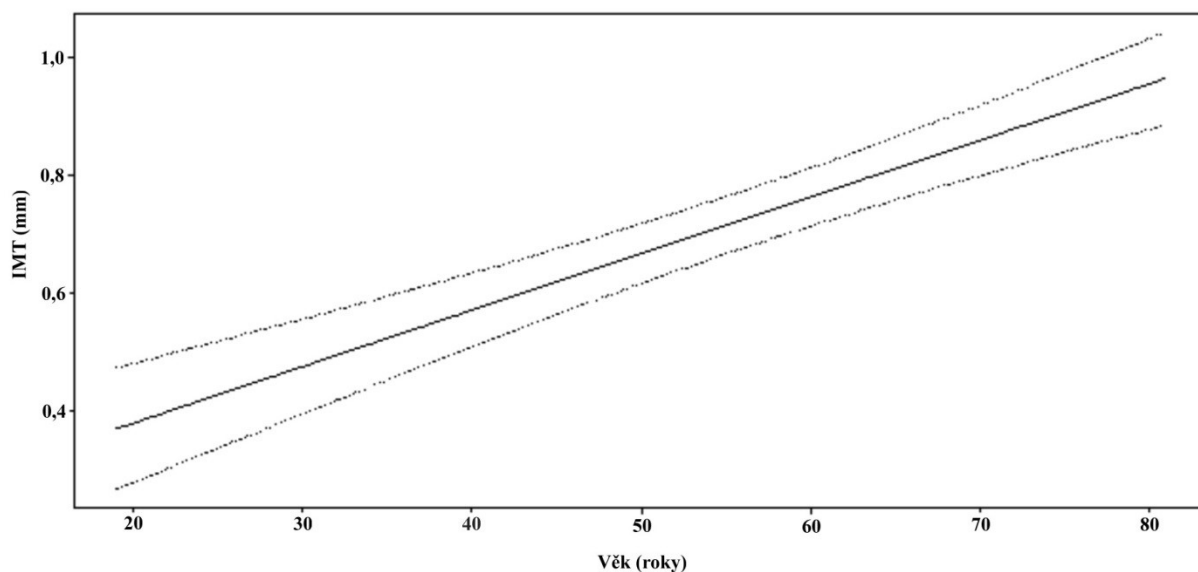
#### **6.2.2.2. Modelování zaměřené na diabetes mellitus 1. typu**

Následující semiparametrické regresní modely byly vypočítávány z dat zahrnujících subjekty zdravé a diabetiky 1. typu. Za závisle proměnnou byla označena průměrná hodnota intimomediální šíře karotid (IMT).

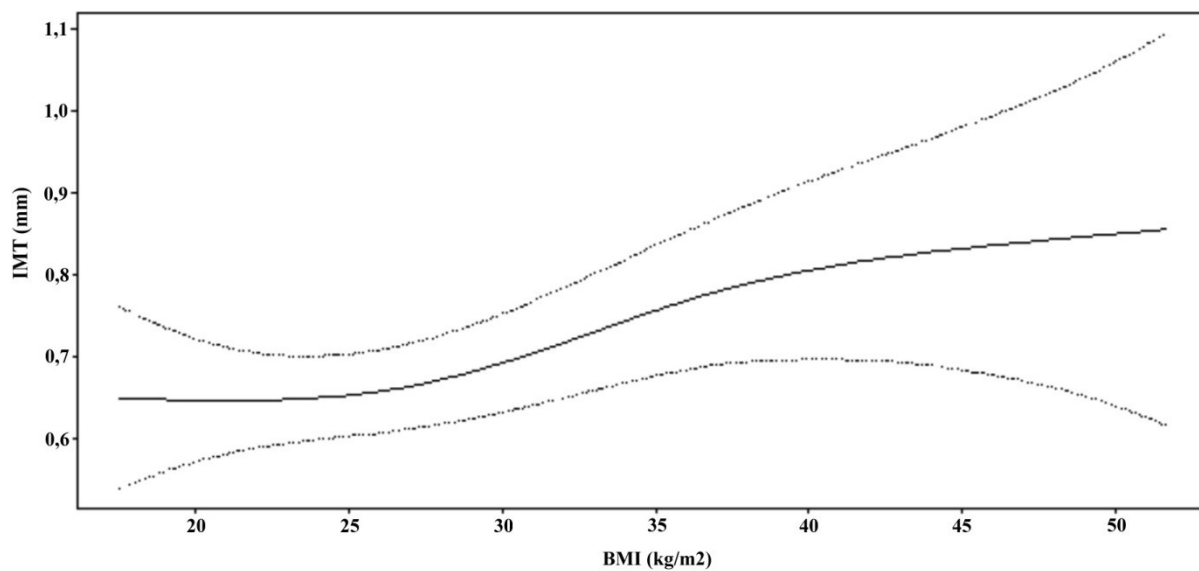
##### 6.2.2.2.1. Základní model

V základním modelu byl hodnocen efekt přítomnosti kardiální autonomní neuropatie (KAN), přítomnosti diabetes mellitus 1. typu, délky trvání DM, věku a body mass indexu (BMI). Korekce na věk a BMI jsou hladké funkce, z modelových odhadů je tedy vidět, jak výrazně je jejich efekt nelineární.

Statisticky významná byla v tomto modelu přítomnost diabetes mellitus 1. typu ( $p=0,02511$ ) i přítomnost KAN ( $p=0,00089$ ), přítomnost obou statusů DM1 i KAN významně interagovala ( $p=0,00089$ ). Efekty DM1 a KAN dle tohoto modelu tedy spolu působily složitěji, než kdyby se jejich efekty jen sčítaly. Nalezena byla signifikantně pozitivní korelace s věkem ( $p<0,00001$ ), efekt věku na intimomediální šíři nebyl v tomto modelu nelineární. (Obrázek 3) Nalezena byla také signifikantně pozitivní korelace s BMI ( $p=0,04350$ ), efekt BMI na IMT byl v tomto modelu nelineární (výraznější navýšení IMT bylo pozorováno při BMI mezi 27 a 37). (Obrázek 4) Vliv délky trvání DM nebyl signifikantní ( $p=0,99401$ ).



Obrázek 3 – Hodnoty karotické intimomediální šíře (IMT) v závislosti na věku pro situaci, kdy není přítomen status DM1 či KAN. Plná čára zobrazuje odhad střední hodnoty IMT, tečkované čáry zobrazují hranice bodově konstruovaného 95% intervalu spolehlivosti.



Obrázek 4 – Hodnoty šíře karotické intimy (IMT) v závislosti na BMI pro situaci, kdy není přítomen status DM1 či KAN. Plná čára zobrazuje odhad střední hodnoty IMT, tečkované čáry zobrazují hranice bodově konstruovaného 95% intervalu spolehlivosti.

#### 6.2.2.2.2. Rozšířený model 1

Aby bylo ověřeno, že vliv KAN na intimomediální šíři karotid, který byl prokázán v základním modelu, na sebe nepřevzme jiná významná proměnná, byl vytvořen rozšířený aditivní model. V tomto modelu byla opět označena šířka karotické intimy za závislou proměnnou, mezi vysvětlující proměnné byly k přítomnosti KAN, diabetu mellitu 1. typu, věku a BMI přidány další rizikové faktory aterosklerózy - hladina LDL cholesterolu, aterogenní index (AI), systolický krevní tlak (sTk), diastolický krevní tlak (dTk) a status kouření.

V tomto rozšířeném modelu byl po započítání všech proměnných prokázán signifikantní vliv přítomnosti KAN ( $p=0,00702$ ), pozitivní signifikantní korelace věku ( $p<0,00001$ ), BMI ( $p=0,04322$ ) a systolického krevního tlaku ( $p=0,00982$ ). Efekt přítomnosti diabetes mellitus 1. typu zde hraničně nevyšel signifikantní ( $p=0,08922$ ), nicméně status přítomnosti DM1 a KAN významně interagoval ( $p=0,00702$ ). Efekty ostatních započítaných vysvětlujících proměnných nebyly signifikantní – LDL ( $p=0,79510$ ), AI ( $p=0,15739$ ), dTk ( $p=0,24615$ ), kouření ( $p=0,31426$ ). Vlivy věku a BMI nebyly v tomto modelu nelineární.

Průměrné hodnoty IMT odhadované z rozšířeného modelu pro 4 kombinace statusu přítomnosti DM1 a KAN jsou uvedeny v Tabulce 6 a Grafu 2.

#### 6.2.2.2.3. Rozšířený model 2

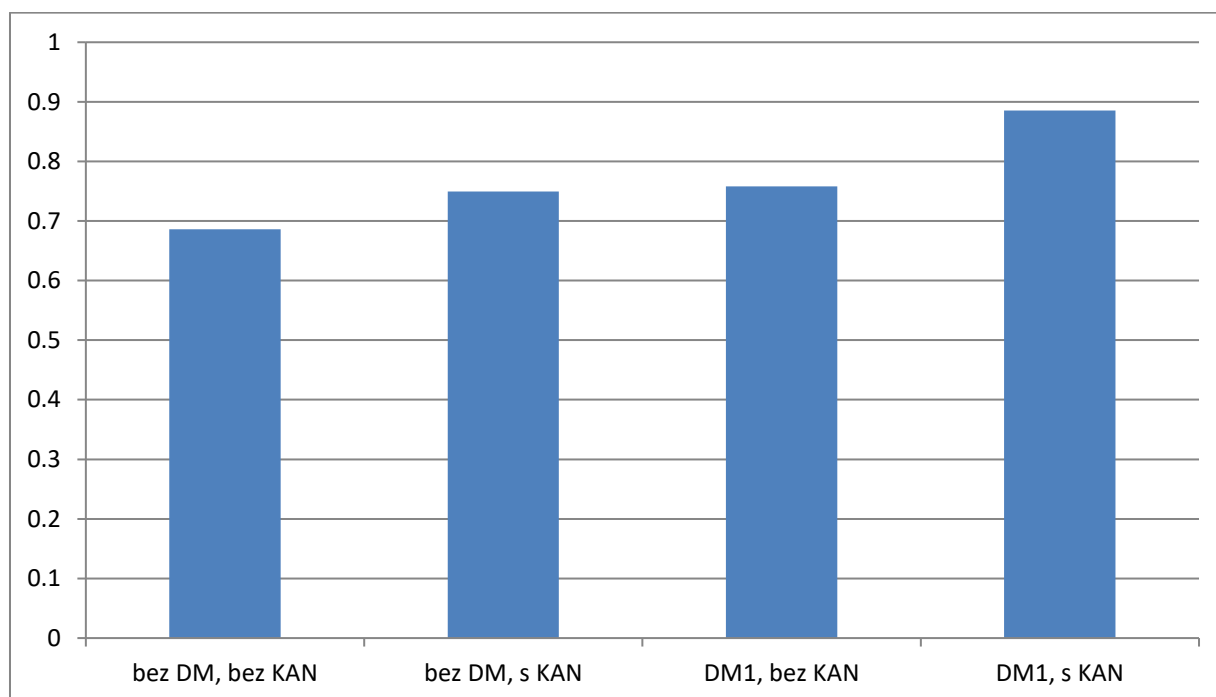
V dalším rozšiřujícím modelu byla opět označena karotická intimomediální šířka za závislou proměnnou, mezi vysvětlující proměnné byly zařazeny tyto parametry: přítomnost KAN, diabetu mellitu 1. typu, délka trvání DM, věk, BMI, systolický krevní tlak, hladina LDL cholesterolu, nově byl kalkulován vliv odlišného pohlaví a vliv hladiny TAG.

V tomto modelu byl prokázán signifikantní vliv pohlaví ( $p=0,00521$ ), přítomnosti diabetes mellitus 1. typu ( $p=0,04924$ ), přítomnosti KAN ( $p=0,00357$ ), věku ( $p<0,00001$ ), BMI ( $p=0,02970$ ), přítomnost DM1 a KAN významně interagovala ( $p=0,00357$ ). Vlivy ostatních vysvětlujících proměnných nebyly signifikantní – délka trvání DM ( $p=0,71600$ ), sTk ( $p=0,37480$ ), LDL ( $p=0,09743$ ), TAG ( $p=0,17880$ ). Vlivy věku a BMI nebyly v tomto modelu nelineární.

Tabulka 6 - Průměry IMT odhadované z modelu pro 4 kombinace statusu DM1 a KAN  
(vyhodnoceno v průměrných hodnotách spojitých kovariát pro nekuřáky)

DM (0-bez DM, 1-DM 1.typu)	KAN (0-bez KAN, 1-s KAN)	Průměr IMT odhadnutý z modelu (mm)	Střední chyba odhadnutá z modelu
0	0	0.6861	0.0268
0	1	0.7497	0.0349
1	0	0.7583	0.0340
1	1	0.8856	0.0411

Graf 2 - Průměry IMT (mm) odhadované z modelu pro 4 kombinace statusu přítomnosti DM1 a KAN (vyhodnoceno v průměrných hodnotách spojitých kovariát pro nekuřáky)



### **6.2.2.3. Modelování zaměřené na diabetes mellitus 2. typu**

Následující semiparametrické regresní modely byly vypočítávány z dat zahrnujících subjekty zdravé a diabetiky 2. typu. Za závisle proměnnou byla označena průměrná hodnota intimomediální šíře karotid (IMT).

#### 6.2.2.3.1. Základní model

V základním modelu byl hodnocen efekt přítomnosti kardiální autonomní neuropatie (KAN), přítomnosti diabetes mellitus 2. typu, délky trvání DM, věku a body mass indexu (BMI).

Statisticky významná byla v tomto modelu přítomnost diabetes mellitus 2. typu ( $p=0,02740$ ). Nalezena byla signifikantně pozitivní korelace s věkem ( $p<0,00001$ ), BMI ( $p=0,01020$ ) a délkou trvání DM ( $p=0,02963$ ). Efekt věku na tloušťku karotické intimy byl v tomto modelu nelineární (zesiloval výrazněji pro skupiny nad 70 let). Efekt BMI a délky trvání DM na intimomediální šířku nebyl nelineární. Vliv KAN na IMT nevyšel signifikantní ( $p=0,22960$ ).

#### 6.2.2.3.2. Rozšířený model 1

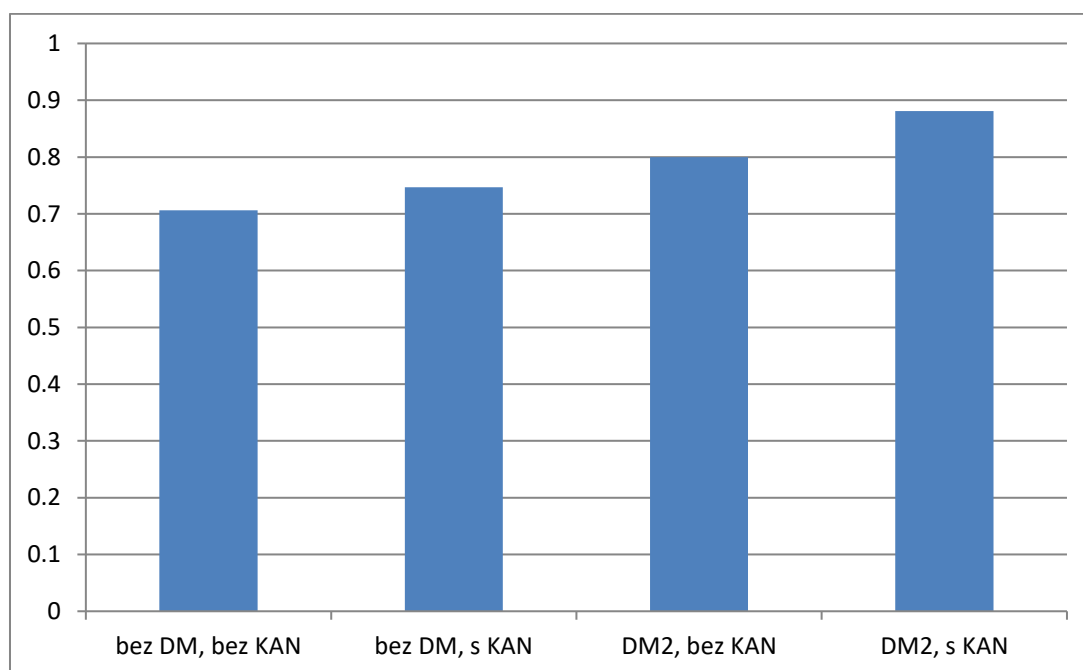
V rozšířeném modelu byla opět označena intimomediální šíře karotid za závislou proměnnou, mezi vysvětlující proměnné byly k přítomnosti KAN, diabetu mellitu 2. typu, délce trvání DM, věku a BMI přidány další rizikové faktory aterosklerózy - hladina LDL cholesterolu, aterogenní index (AI), systolický krevní tlak (sTk), diastolický krevní tlak (dTk), status kouření.

V rozšířeném modelu byla po započítání daných proměnných nalezena pozitivní signifikantní korelace věku ( $p<0,00001$ ), délky trvání DM ( $p=0,04562$ ) a BMI ( $p=0,03830$ ). Efekt věku na IMT byl v tomto modelu nelineární (zesiloval pro věkové skupiny nad 70 let). Efekty BMI a trvání DM na IMT nebyly v tomto modelu nelineární. Přestože byly modelované hodnoty IMT u pacientů s diabetem mellitem 2. typu vyšší, statisticky nebyla prokázána signifikantní korelace ( $p=0,09553$ ). Taktéž vliv KAN nevyšel signifikantní ( $p=0,13848$ ), i když diabetici s KAN měli v průměru vyšší hodnoty IMT. Efekty ostatních vysvětlujících proměnných nebyly signifikantní – LDL ( $p=0,45564$ ), AI ( $p=0,50377$ ), sTK ( $p=0,28909$ ), dTK ( $p=0,15117$ ), kouření ( $p=0,64149$ ). Průměrné hodnoty IMT odhadované z rozšířeného modelu pro 4 kombinace statusu přítomnosti DM2 a KAN jsou uvedeny v Tabulce 7 a Grafu 3.

Tabulka 7 - Průměry IMT odhadované z modelu pro 4 kombinace statusu DM2 a KAN  
(vyhodnoceno v průměrných hodnotách spojitých kovariát pro nekuřáky)

DM	KAN	Průměr IMT odhadnutý z modelu (mm)	Střední chyba odhadnutá z modelu
0	0	0.7061	0.0381
0	1	0.7466	0.0454
2	0	0.8000	0.0569
2	1	0.8809	0.0575

Graf 3 - Průměry IMT (mm) odhadované z modelu pro 4 kombinace statusu přítomnosti DM2 a KAN (vyhodnoceno v průměrných hodnotách spojitých kovariát pro nekuřáky)





#### 6.2.2.3.3. Rozšířený model 2

V dalším rozšiřujícím modelu byla opět označena karotická intimomediální šířka za závislou proměnnou, mezi vysvětlující proměnné byly zařazeny tyto parametry: přítomnost KAN, diabetu mellitu 2. typu, délka trvání DM, věk, BMI, systolický krevní tlak, hladina LDL cholesterolu, nově byl kalkulován vliv odlišného pohlaví a vliv hladiny TAG.

V tomto modelu byl prokázán signifikantní vliv věku ( $p < 0,00001$ ), pohlaví ( $p = 0,03140$ ), délky trvání DM ( $p = 0,02921$ ) a TAG ( $p = 0,0422$ ). Vliv věku byl v tomto modelu nelineární (zesiloval výrazněji pro skupiny nad 65 let). Vliv délky trvání DM nebyl nelineární. Vliv přítomnosti diabetes mellitus 2. typu byl na hranici významnosti ( $p = 0,062462$ ). Vliv ostatních proměnných nevyšel signifikantní – KAN ( $p = 0,61110$ ), LDL ( $p = 0,07031$ ), BMI ( $p = 0,08322$ ), sTk ( $p = 0,8836$ ).

### 6.3.Diskuze

Kardiovaskulární onemocnění jsou hlavní příčinou morbidity a mortality diabetických pacientů (*Paneni et al., 2013*). Pacienti s diabetes mellitus mají dvakrát vyšší riziko výskytu ischemické choroby srdeční, kardiálního selhání a cévních mozkových příhod oproti nediabetické populaci (*Lee et al., 2001*).

Z pohledu prevence kardiovaskulárních komplikací je důležitá včasná identifikace rizikových osob, která by následně vedla skrze adekvátní farmakoterapeutický zásah ke zpomalení aterosklerotického procesu, oddálení makrovaskulárních komplikací a zlepšení prognózy pacientů. Záchyt časných známek aterosklerózy v době, dokud probíhá zcela asymptomaticky, má z preventivního hlediska velký význam. K detekci preklinické aterosklerózy je doporučováno společností American Heart Association měření intimomediální šíře karotických tepen (*Greenland et al., 2000*). Hodnota IMT CCA signifikantně koreluje s výskytem infarktu myokardu, cévních mozkových příhod a smrti (*Lorenz et al., 2006*). Měření intimomediální šíře karotických tepen se zdá být excelentní metodou k detekci subklinických známek aterosklerózy, neboť je zcela neinvazivní, nenese žádná rizika, výsledek je dobře reprodukovatelný a umožňuje velmi dobrou detekci aterosklerotických plátů v kterémkoliv věku (*Cobble, Bale, 2010*).

Chronická hyperglykémie je považována za hlavní příčinu diabetických makrovaskulárních komplikací (*Nathan et al., 1993; Grundy et al., 1999*). V minulosti byla popsána řada dějů, skrze které vede hyperglykémie k strukturálním a funkčním změnám cévní stěny a rozvoji aterosklerózy. Patří k nim tvorba pokročilých produktů glykace, změna intracelulárních signalizačních drah, zvýšení oxidačního stresu i vyšší agregace trombocytů a riziko tvorby trombů (*Laakso, 1999; Grundy et al., 1999; Aronson, Rayfield, 2002; Grant et al., 2007*).

U pacientů s diabetes mellitus 2. typu hraje ústřední roli v rozvoji vaskulární dysfunkce inzulinová rezistence a s ní spřažené metabolické změny. Na progresi aterosklerózy se u obézních pacientů podílí akumulace tukové tkáně, změny metabolismu lipidů a tvorba prozánětlivých markerů (*Kim et al., 2006; Paneni et al., 2013*). Přesto přesný mechanismus, kterým diabetes mellitus akceleruje rozvoj aterosklerózy a kardiovaskulárních onemocnění není zcela znám (*Lopes-Virella et al., 2007*).

Práce Colhouna a kolektivu z roku 2001 naznačuje, že kalcifikace koronárních tepen jsou u pacientů s diabetes mellitus 1. typu asociovány s nižší variabilitou srdeční frekvence

(Colhoun *et al.*, 2001), ukazatelem kardiální autonomní neuropatie. V roce 2010 Rodrigues a kol. publikovali studii, která prokázala, že nižší variabilita srdeční frekvence může být prediktorem progresu kalcifikace koronárních arterií u dospělých diabetiků 1. typu (Rodrigues *et al.*, 2010). Jung a kol. demonstrovali v roce 2013 asociaci kardiální autonomní neuropatie a ztlustění karotické intimy u pacientů s diabetes mellitus 2. typu (Jung *et al.*, 2013). Zdá se tedy, že snížená variabilita srdeční frekvence (jako odraz poškození autonomních nervů) je asociována s markery aterosklerotického poškození cév.

Naše práce hodnotila vliv kardiální autonomní neuropatie na IMT CCA u pacientů s diabetem mellitem 1. a 2. typu při započítání rizikových faktorů aterosklerózy v porovnání s nediabetickou populací. Řada prací prokázala, že pacienti s diabetes mellitus 1. a 2. typu mají vyšší hodnoty šíře karotické intimy v porovnání s nediabetickou populací (Sun *et al.*, 2015; Kozakova *et al.*, 2019; Senyigit *et al.*, 2019). Tyto nálezy jsou ve shodě s našimi výsledky. Naše práce prokázala signifikantní vliv přítomnosti kardiální autonomní neuropatie na hodnoty IMT CCA u pacientů s diabetes mellitus 1. typu i po započítání známých rizikových faktorů aterosklerózy. Není nám známo, že by byla obdobná práce dříve publikována.

Nepodařilo se nám prokázat signifikantní vliv KAN na IMT CCA u pacientů s diabetes mellitus 2. typu. Přestože byly modelované hodnoty IMT CCA u diabetiků 2. typu trpících KAN po započítání vlivu rizikových faktorů aterosklerózy vyšší, neprokázali jsme u této skupiny pacientů, že by efekt přítomnosti KAN na IMT CCA byl významný. Předpokládáme, že tento výsledek byl podmíněn menším počtem námi vyšetřených pacientů ve skupině diabetiků 2. typu. K tomuto závěru nás vede i fakt, že v minulosti byla již negativní vazba hodnot parametrů variability srdeční frekvence a karotické IMT u diabetiků 2. typu prokázána (Meyer *et al.*, 2004; Fakhrzadeh *et al.*, 2012; Jung *et al.*, 2013).

Při spojení dat diabetiků 1. a 2. typu byla v naší práci prokázána v několikastupňovém rozšiřujícím se modelu semiparametrické regrese signifikantní interakce efektů přítomnosti KAN a diabetes mellitus k hodnotám IMT CCA. Prokázána byla taktéž interakce efektů KAN s věkem a KAN s BMI. V našem modelování byl tedy v KAN pozitivních skupinách nárůst IMT CCA se zvyšujícím se věkem a BMI rychlejší.

Výše uvedené výsledky naznačují, že by v patogenezi aterosklerotického poškození cév pacientů s diabetes mellitus mohla hrát roli i kardiální autonomní neuropatie. Nabízí se

několik možných mechanismů, kterými by kardiální autonomní neuropatie mohla vést k progresi aterosklerózy.

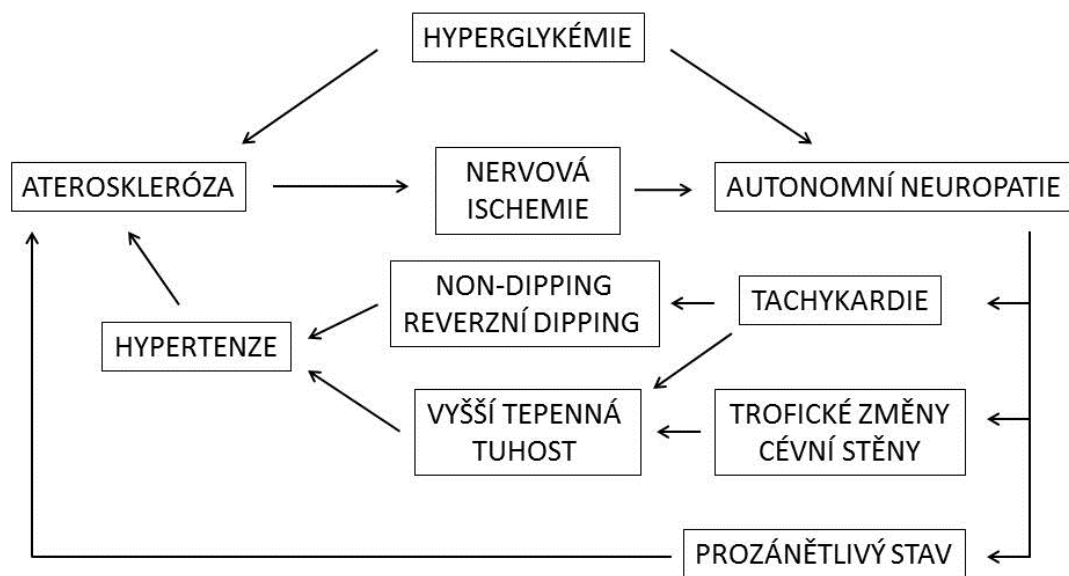
Prvním mechanismem je zvýšení krevního tlaku. Autonomní nervový systém je zodpovědný za optimální regulaci srdeční frekvence, síly stahu srdečního svalu a napětí cévní stěny. Krevní tlak se společně se srdeční frekvencí fyziologicky snižuje v průběhu spánku jako důsledek zvýšené aktivace parasympatického nervového systému. Tento fenomén je nazýván noční dipping a je charakterizován alespoň 10% poklesem krevního tlaku oproti průměrným denním hodnotám. Je známo, že poškození nervových vláken je závislé na délce nervu. Tento fakt vysvětluje predominantní lézi parasympatiku (*nervus vagus*) v časném stádiu KAN (*Yagihashi et al., 2007*). Dysfunkce *nervus vagus* a relativní hyperaktivita sympatiku v časném stádiu KAN je nejpravděpodobnější příčinou nedostatečného poklesu krevního tlaku v průběhu spánku (tzv. “non-dipping“) či dokonce zvýšení hodnot krevního tlaku v průběhu noci (tzv. “reverzní dipping“) (*Bissinger et al., 2017*). Non-dipping a reverzní dipping je asociován s hypertrofií levé komory srdeční a kardiovaskulárními příhodami (*Verdecchia et al., 1990; Kuwajima et al., 1992; Spallone et al., 1993; Mancia et al., 1997*). Meta-analýza Cuspidiho a kol. prokázala vazbu non-dippingu a zvýšeného rizika subklinické aterosklerózy (*Cuspidi et al., 2016*). Další práce sledující adolescentní diabetiky 1. typu zjistila, že abnormální zvýšení krevního tlaku v průběhu nočních hodin předchází rozvoji mikroalbuminurie (markeru glomerulární a vaskulární dysfunkce) (*Lurbe et al., 2002*). Výše zmíněné studie podporují závěry Vinika a kol. z roku 2003, který vyvozuje, že poškozený vzorec sympatovagální aktivity, noční zvýšení krevního tlaku a nasedající komplikace reprezentují významný mechanismus vysvětlující zvýšenou mortalitu diabetiků trpících KAN (*Vinik et al., 2003*).

Další cestou vedoucí ke zvýšení krevního tlaku by mohlo být ovlivnění tuhosti tepen. Existují práce indikující, že je KAN asociována s vyšší arteriální tuhostí (*Liatis et al., 2011; Bagherzadeh et al., 2013; Theilade et al., 2013*). Zvýšená tuhost tepen vede k vyššímu odporu cévní stěny a ke zvýšení systolického tlaku. Vyšší krevní tlak podporuje rozvoj aterosklerózy. Vysvětlením pro zvýšenou tuhost tepen by opět mohla být relativní hyperaktivita sympatického nervového systému v časném stádiu KAN. Vyšší tonus sympatiku vede ke zvýšení srdeční frekvence. U diabetiků s KAN se proto setkáváme s klidovou tachykardií. V animálních modelech na krysách bylo prokázáno, že experimentální zvýšení srdeční frekvence podmiňuje snížení arteriální roztažnosti (*Mangoni et al., 1996; Mangoni et al., 1997; Mircoli et al., 1999*). Kromě toho bylo zjištěno, že přerušení vláken *nervus vagus* je

asociováno s vyššími hodnotami prokolagenové mRNA ve stěně ovlivněných cév (*Carver et al., 1997*). Tyto nálezy naznačují, že alterace autonomního nervového systému může mít negativní efekt na trofiku tepenné stěny a může vést ke zvýšení arteriální tuhosti. Tuto hypotézu podporují výsledky prospektivní studie Prince a kol. publikované v roce 2010. Ta ukázala, že snížení variability srdeční frekvence je u diabetiků 1. typu asociováno s vyšší arteriální tuhostí i po 18ti letech trvání onemocnění (*Prince et al., 2010*).

Experimentální práce ukázaly, že autonomní nervový systém moduluje systémovou zánětlivou odpověď skrze cholinergní protizánětlivou cestu. U krys elektrická stimulace nervus vagus vede in vivo k inhibici syntézy TNF a snižuje vrcholové sérové hodnoty TNF (*Borovikova et al., 2000*), byl také identifikován podtyp nikotinového acetylcholinového receptoru, skrze který acetylcholin inhibuje uvolnění TNF z makrofágů (*Wang et al., 2003*). Rodrigues a kol., který publikoval v roce 2010 práci prokazující vztah nižší variability srdeční frekvence a progresi kalcifikace koronárních arterií, předložil k diskuzi hypotézu, že autonomní neuropatie vede k prozánětlivému nastavení imunitního systému a mohla by touto cestou teoreticky podporovat progresi aterosklerózy (*Rodrigues et al., 2010*). Recentní studie z roku 2017 zjistila asociaci nižší variability srdeční frekvence (HRV) a počtu bílých krvinek (WBCC), tato studie také popsala inverzní asociaci zánětlivých markerů (WBCC a CRP) s citlivostí baroreflexu a plochou karotických aterosklerotických plaků (*Ulleryd et al., 2017*). Jiná studie popsala vazbu nižší HRV a vyšších hodnot karotické IMT s hodnotami CRP a IL6 (*Pizzi et al., 2010*). Přestože se zdá, že jsou nižší hodnoty parametrů HRV asociovány s vyššími hladinami zánětlivých markerů, ke stanovení jednoznačného příčinného vztahu autonomní dysfunkce, prozánětlivé odpovědi a progresi aterosklerózy by byly zapotřebí prospektivní studie. Všechny diskutované patofyziologické cesty propojující KAN a aterosklerózu shrnuje ve zjednodušeném schématu Obrázek 5.

Přestože si uvědomuji limity naší práce (průřezový charakter studie, reprezentativní ale ne zcela velký počet vyšetřených probandů), domnívám se, že jsme demonstrovali nová fakta, která rozšiřují dostupné vědecké poznání o vztahu diabetes mellitus, autonomní neuropatie a aterosklerózy.



Obrázek 5: Diskutované patofyziologické mechanismy vazby KAN a aterosklerózy

## 7. Rekurentní analýza variability srdeční frekvence u pacientů s autonomní dysfunkcí (řešení hypotézy 3 a 4)

### 7.1. Rekurentní analýza HRV u pacientů s vazovagální synkopou

#### 7.1.1. Metodika práce

##### 7.1.1.1. Studovaný soubor

V pilotním projektu zaměřeném na zhodnocení možnosti využití rekurentní analýzy variability srdeční frekvence k popisu autonomní dysfunkce u pacientů s vazovagálními synkopami bylo vyšetřeno 36 probandů rozdělených do 2 skupin. Do první vyšetřované skupiny bylo zařazeno 18 pacientů s vazovagálními synkopami. V synkopové skupině byli 2 muži a 16 žen (průměrný věk  $23,7 \pm 5,2$  roku). Druhá skupina byla složena z 18 zdravých pacientů, 9 mužů a 9 žen (průměrný věk  $24,5 \pm 3,2$  roku). Skupiny byly věkově vyvážené. Věkové rozložení studovaného souboru shrnuje Tabulka 8. V synkopové skupině převažoval počet žen, kontrolní skupina byla z hlediska pohlaví vyvážená. Skupiny tak nebyly stejné poměrem žen a mužů, nicméně dle studie Pietruchy a kol. z roku 2009 jsou vazovagální synkopy diagnostikovány ve srovnatelném poměru u mužů i žen a nebyly prokázány signifikantní vztahy mezi pohlavím a výsledky ortostatického testu (*Pietrucha et al., 2009*).

U žádného ze subjektů nebylo známo, že by prodělal kardiovaskulární příhodu, trpěl ischemickou chorobou srdeční, poruchou srdečního rytmu, thyreopatií či jiným vážným onemocněním.

Všichni probandi byli obeznámeni s průběhem a účelem studie, svůj souhlas s účastí ve studii potvrdili podpisem informovaného souhlasu. Studie byla schválena Etickou komisí FN Motol. Vyšetření probíhala v letech 2012-2014.

Tabulka 8 - Věkové rozložení studovaného souboru		
	Zdravá skupina	Synkopová skupina
Průměrný věk (roky)	$24,5 \pm 3,2$	$23,7 \pm 5,2$
Minimální věk (roky)	20	15
Maximální věk (roky)	33	33

#### **7.1.1.2. Vyšetření variability srdeční frekvence**

K zhodnocení variability srdeční frekvence byl zvolen polohový test zahrnující 5ti minutovou fázi klidného lehu a 5ti minutovou fázi aktivního stoje. Studovaní probandi byli poučeni, aby se alespoň 12 hodin před vyšetřením vyvarovali kouření, konzumace kofeinu a pití alkoholu. Vyšetření probíhalo za standardizovaných podmínek (tichá klidná místnost, teplotní komfort, v dopoledních hodinách, absence akutního infekčního onemocnění) v Neurofyziologické laboratoři FN Motol. Před zahájením testu byli vyšetřovaní požádáni, aby leželi po dobu 15 minut v klidu vleže, teprve poté byl zahájen polohový test. První fáze polohového testu sestávala z 5 minut klidného lehu, následně byli pacienti vyzváni k postavení. Abychom zabránili zkreslení EKG záznamu artefakty, které mohou vzniknout svalovou kontrakcí v průběhu postavení, hodnocení EKG záznamu ve fázi stoje bylo zahájeno až v okamžiku vymizení artefaktů (obvykle 10-15 sekund po postavení), následně bylo zaznamenáno 5 minut fáze aktivního stoje. Při polohovém testu byl pořizován EKG záznam a měření krevního tlaku přístrojem FAN (výrobce Schwarzer, Německo). Softwarově byly z EKG záznamu získány sekvence R-R intervalů (intervalů po sobě jdoucích srdečních stahů), které byly dále analyzovány dle standardních algoritmů (Ziegler *et al.*, 1992; Haegele-Link *et al.*, 2008).

#### **7.1.1.3. Analýza R-R intervalů**

Sekvence R-R intervalů byly analyzovány v časové doméně a frekvenční (spektrální) analýzou. Kromě těchto standardních metod byla provedena i rekurentní analýza variability srdeční frekvence.

##### 7.1.1.3.1. Časová analýza

V rámci analýzy v časové doméně byly vypočteny následující parametry:

- průměrná délka R-R intervalů
- průměrná srdeční frekvence (HR)
- směrodatná odchylka po sobě následujících normálních R-R intervalů (SDNN)
- směrodatná odchylka srdeční frekvence (SDHR)
- druhá odmocnina průměru čtverců odchylek po sobě následujících normálních R-R intervalů (RMSSD)
- počet R-R intervalů, které se od sebe liší o více než 50 ms (NN50)



- procentuální zastoupení NN50 z celkového počtu R-R intervalů (pNN50)

Parametry odvozené z geometrických metod (trojúhelníková interpolace normálních po sobě následujících R-R intervalů a HRV trojúhelníkový index) nebyly hodnoceny, neboť nejsou vhodné k hodnocení krátkých EKG záznamů (*Perk et al., 2012*).

#### 7.1.1.3.2. Frekvenční analýza

K přímému zhodnocení sympatovagální aktivity byla provedena spektrální (frekvenční) analýza zaznamenaných R-R intervalů. K tomu byl použit validovaný software Kubios (*Niskanen et al., 2004*). Spektrální analýza HRV rozlišuje 3 frekvenční pásma, která popisují chování autonomního nervového systému. Pásmo velmi nízkých frekvencí (VLF) o rozsahu 0,0033-0,04 Hz indikující celkovou aktivitu pomalých funkčních mechanismů sympatiku, pásmo nízkých frekvencí (LF) o rozsahu 0,04-0,15 Hz odrážející aktivitu sympatiku i parasympatiku (obecně je hlavním ukazatelem aktivity sympatiku) a pásmo vysokých frekvencí (HF) o rozsahu 0,15-0,40Hz, které vypovídá o vagové (parasympatické) aktivitě (*Vlčková et al., 2010; Perk et al., 2012*). Pro všechna frekvenční pásma byly vypočteny hodnoty spektrálního výkonu. Hodnoceny byly parametry LF, HF a poměr LF/HF, který odráží rovnováhu mezi aktivitou sympatiku a parasympatiku. Tyto parametry byly použity i v předchozích studiích zaměřených na hodnocení HRV u pacientů s vazovagálními synkopami (*Kochiadakis et al., 1998; Piccirillo et al., 2004*).

#### 7.1.1.3.3. Rekurentní analýza

Záznamy sekvencí R-R intervalů hodnocené časovou a frekvenční analýzou (lineárními metodami) byly použity k vypočítání rekurentní analýzy variability srdeční frekvence (jednou z nelineárních metod využívanou k popisu dynamických systémů).

Rekurentní analýza patří mezi nelineární datové analýzy, které byly odvozeny z teorie chaosu. Opakování je základní vlastností disipativních dynamických systémů (*Trauth, Sillmann, 2013*). Hlavním nástrojem rekurentní analýzy k vizualizaci opakujícího se chování dynamického systému je rekurentní graf.

Rekurentní analýza sestává ze 3 kroků. Prvním krokem je rekonstrukce fázového prostoru. Druhým krokem rekurentní analýzy je tvorba rekurentního grafu pomocí vstupního parametru

prahové vzdálenosti sousedních bodů. Posledním krokem je výpočet proměnných rekurentní kvantifikační analýzy z rekurentního grafu.

Rekurentní analýza začíná rekonstrukcí fázového prostoru. Fázový prostor je prostor všech možných stavů modelovaného systému. K popisu uspořádání modelovaného systému jsou použity stavové veličiny. Fázový prostor bývá  $n$ -rozměrný pro  $n$  stavových veličin (Dvořák, Šiška, 1991). Hodnoty stavových veličin lze zobrazit bodem ve fázovém prostoru, každý získaný bod ve fázovém prostoru reprezentuje určitý stav systému. Nejčastěji používanou metodou pro rekonstrukci fázového prostoru je vnoření dimenze a časového zpoždění na základě Takensovy věty:

$$x_i = (y_i, y_{i+\tau}, \dots, y_{i+(m-1)\tau})^T$$

V Takensově větě představuje  $x_i$  pozorovanou stavovou veličinu,  $\tau$  je časové zpoždění,  $m$  je vkládaná dimenze a  $T$  je čas (Marwan et al., 2002; Kodera, Tran, 2009; Trauth, Sillmann, 2013).

Často je nemožné sledovat více než jednu stavovou proměnnou, neboť jsou stavové proměnné neznámé či obtížně měřitelné. Avšak použití Takensovy věty umožňuje rekonstruovat trajektorii fázového prostoru z jednoho pozorování (Trauth, Sillmann, 2013). Pro rekonstrukci fázového prostoru byla v našem modelování použita jako vstupní signál délka sousedních normálních R-R intervalů.

Pro rekonstrukci fázového prostoru je potřeba zadat parametry časového zpoždění a dimenze. K volbě optimálního časového zpoždění byla zvolena metoda výpočtu míry vzájemné informace, která je vhodná i pro nelineární procesy (Kodera, Tran, 2009). Míra vzájemné informace představuje informaci o vzájemné závislosti 2 náhodných veličin. Čím je jejich závislost větší, tím je větší jejich vzájemná informace (Zvárová, 2011). Jako nejvhodnější délka časového zpoždění je pak zadáno první minimum vzájemné informace. Vzájemná informace 2 proměnných byla stanovena pomocí entropie:

$$I(A,B) = H(A) + H(B) - H(A,B)$$

Ve výše uvedeném vzorci jsou  $H(A)$  a  $H(B)$  entropie a  $H(A,B)$  je sdružená entropie A a B.

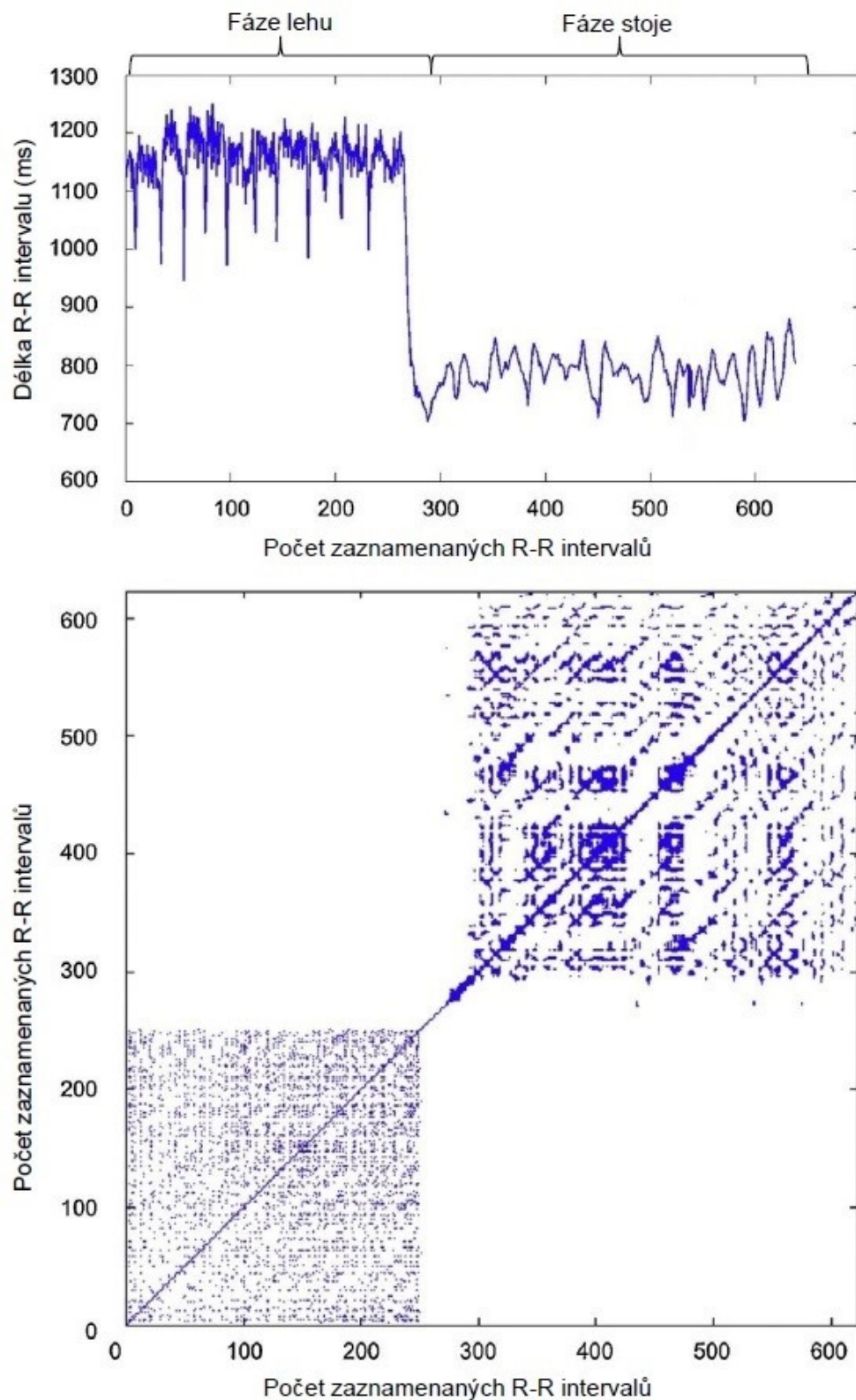
Dále je třeba zvolit optimální dimenzi vnoření. Ta odráží počet rekonstruovaných tvarů prostorových dimenzí. Jednou z nejběžněji užívaných metod pro volbu optimální dimenze vnoření je metoda nejbližších falešných sousedů (Kodera, Tran, 2009). V naší studii byla použita modifikovaná metoda nejbližších falešných sousedů od L.Caa (Cao, 1997).

Po rekonstrukci fázového prostoru jsou vytvořeny rekurentní grafy, které slouží ke grafickému zobrazení rekurentních stavů. Příklady vzhledu rekurentních grafů jsou zobrazeny na Obrázcích 6 a 7. K přesnému popisu rekurentních grafů slouží kvantitativní parametry rekurentní analýzy:

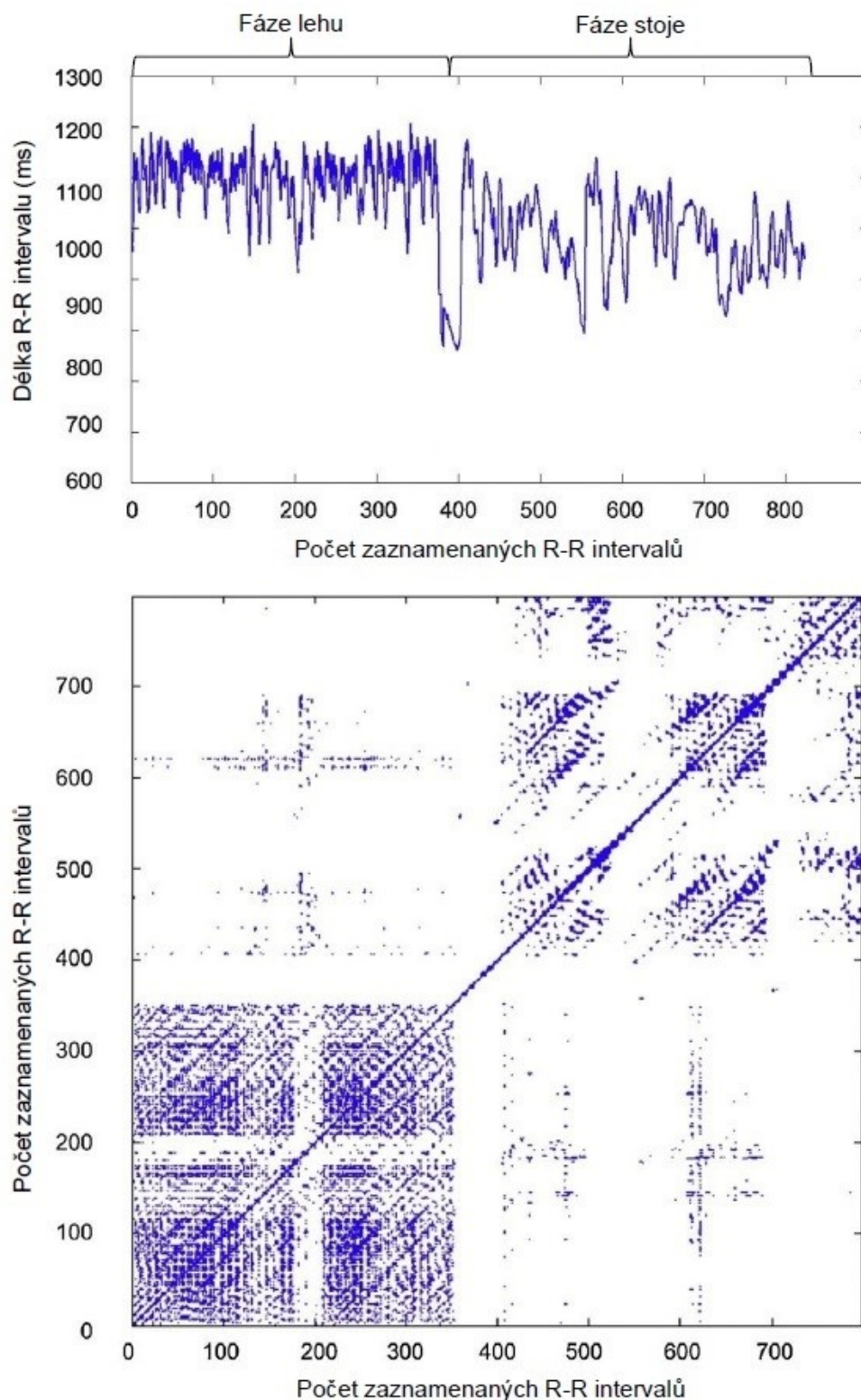
- Procento rekurentních bodů (RR) – RR je procento, které tvoří rekurentní graf. Tento parametr odpovídá pravděpodobnosti, že se konkrétní stav bude opakovat. Vyšší rekurence znamená nižší variabilitu systému a naopak (*Marwan et al., 2002*).
- Determinismus (DET) – DET představuje procento rekurentních bodů, které tvoří diagonální čáry rekurentního grafu. Diagonální čáry ukazují, že se systém vrací k předchozím stavům v jiném čase. Parametr souvisí s předvídatelností dynamického systému.
- Laminarita (LAM) – LAM označuje procento rekurentních bodů, které tvoří svislé čáry. Parametr slouží k detekci laminárních stavů, kdy se stav systému nemění či se mění velmi pomalu.
- Rekurentní čas (TT) – TT představuje průměrnou délku svislých čar. Parametr říká, jak dlouho systém setrvává v konkrétním stavu. Nízká hodnota LAM a TT značí velkou složitost systému, systém se vrací do předchozích stavů jen na krátkou dobu (*Javorka et al., 2008*).
- Nejdelší vertikální čára (MAXV) – MAXV představuje nejdelší setrvání v konkrétním stavu.
- Průměrná délka diagonálních čar (AVDL) a nejdelší diagonální čára (LMAX) – značí, jak se systém vrací do stejných stavů v různých časech.
- Divergence (DIV) – převrácená hodnota LMAX
- Entropie (ENTR) – ENTR je Shannonova entropie délek diagonálních čar. Určuje míru složitosti signálu. Systém s velkým rozpětím délek diagonálních čar bude mít vyšší entropii oproti systému, který bude mít všechny diagonální čáry stejně dlouhé.
- Ratio (RATIO) – RATIO je poměr mezi DET a RR. Slouží k odhalení skrytých přechodů stavů systému. Během některých přechodů se RR může snižovat, ale DET zůstává stejný (*Marwan et al., 2002*).

Pro rekurentní analýzu je důležité nastavení prahové vzdálenosti, která určuje, kdy můžeme předpokládat výskyt rekurentního stavu. Rekurentní stav je určen v případě, kdy je trajektorie

mezi dvěma stavy menší než práh. Řada studií se zaměřovala na výběr optimální prahové vzdálenosti. Jednou z nejpoužívanějších metod je nastavení fixního procenta rekurentních bodů, obecně bývá používáno 1,5% - 15% (*Javorka et al., 2008; Schinkel et al., 2008; Ding et al., 2008; Acharya et al., 2011*). V naší analýze bylo za prahovou hodnotu zvoleno 2,5% rekurentních bodů. Podrobnější popis výpočtu rekurentní analýzy je nad rámec této práce. Detailně se mu věnuje článek o využití rekurentní analýzy v medicíně z roku 2014 (*Schlenker et al., 2014*).



Obrázek 6 – Příklad tvorby rekurentního grafu zdravého probanda. Horní část obrázku zobrazuje změnu délky R-R intervalů v průběhu polohového testu (zdrojová data rekurentní analýzy). Dolní část obrázku zobrazuje příslušný rekurentní graf.



Obrázek 7 – Příklad tvorby rekurentního grafu pacienta trpícího synkopami. Horní část obrázku zobrazuje změnu délky R-R intervalů v průběhu polohového testu (zdrojová data rekurentní analýzy). Dolní část obrázku zobrazuje příslušný rekurentní graf.

#### 7.1.1.4. Statistická analýza

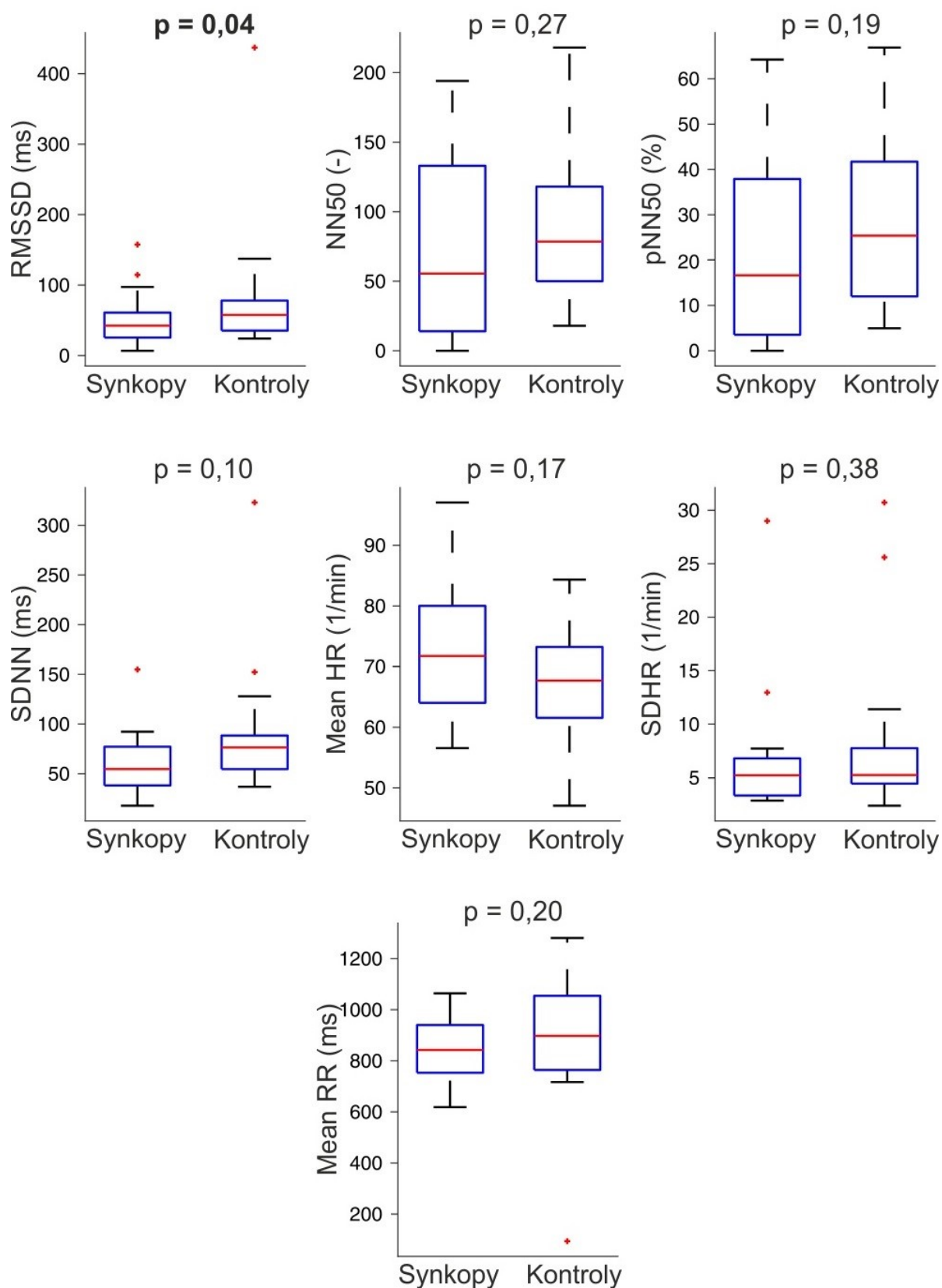
Parametry časové, frekvenční a rekurentní analýzy byly statisticky analyzovány pro obě části testu ( fáze vleže a fáze vestoje). Pro ověření normality distribuce parametrů v každé skupině byl použit Kolmogorov-Smirnovův test. Neboť byla zamítnuta hypotéza o normálním rozdělení dat, byly parametry dále hodnoceny pomocí Wilcoxonova testu. Výsledky s  $p$  nižším než 0,05 byly hodnoceny jako signifikantní. Výsledky a pozorované rozdíly hodnocených parametrů mezi skupinami (synkopy vs. kontroly) byly vizualizovány formou krabicových grafů. Krabicové grafy zobrazují průměrné hodnoty, první a třetí kvartil, maximální, minimální a extrémní hodnoty. Výpočty a statistická analýza byly provedeny v programovém prostředí MAT-LAB (*MATLAB R2013a, MathWorks, Inc., Natick, MA, USA*).

#### 7.1.2. Výsledky

V rámci hodnocení parametrů časové analýzy variability srdeční frekvence byl ve fázi lehu nalezen pouze jeden parametr, který byl signifikantně odlišný mezi skupinou synkop a zdravými kontrolami. Tímto parametrem byl RMSSD ( $p=0,0421$ ). Ve fázi stoje byly prokázány signifikantní rozdíly u parametrů SDNN ( $p=0,0111$ ), Mean HR ( $p=0,0018$ ), NN50 ( $p=0,0031$ ), pNN50 ( $p=0,0042$ ) a Mean RR ( $p=0,0020$ ). Na Obrázku 8 jsou výsledky časové analýzy ve fázi lehu, na Obrázku 9 pro fázi stoje.

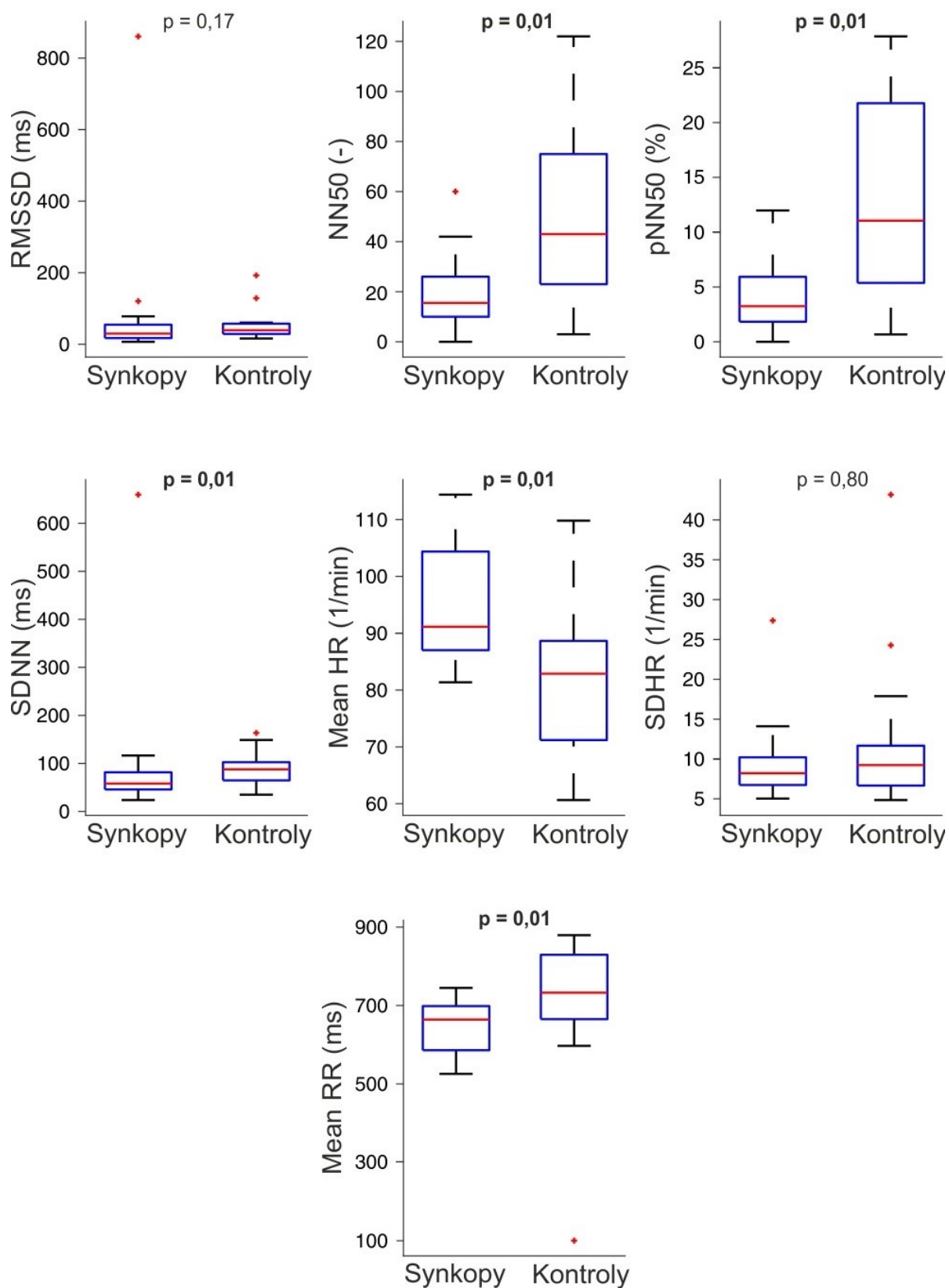
Z parametrů frekvenční (spektrální) analýzy byl prokázán signifikantní rozdíl mezi skupinami ve fázi lehu u LF ( $p=0,0032$ ). Ve fázi stoje nebylo prokázáno, že by byl v parametrech spektrální analýzy mezi skupinami signifikantní rozdíl. Na Obrázku 10 jsou krabicové grafy s výsledky frekvenční analýzy z obou fází polohového testu.

Parametry rekurentní analýzy nebyly signifikantně odlišné mezi skupinami ve fázi lehu. Výsledky shrnuje Obrázek 11. Ve fázi stoje byly však prokázány signifikantní rozdíly mezi skupinami pro většinu parametrů rekurentní analýzy. Ve skupině synkop byly zaznamenány signifikantně vyšší hodnoty parametrů DET, LAM, MAXV, TT, AVDL, RATIO, LMAX a nižší DIV. Parametr ENTR nevyšel ve fázi stoje signifikantní. Výsledky z fáze stoje zobrazuje Obrázek 12.



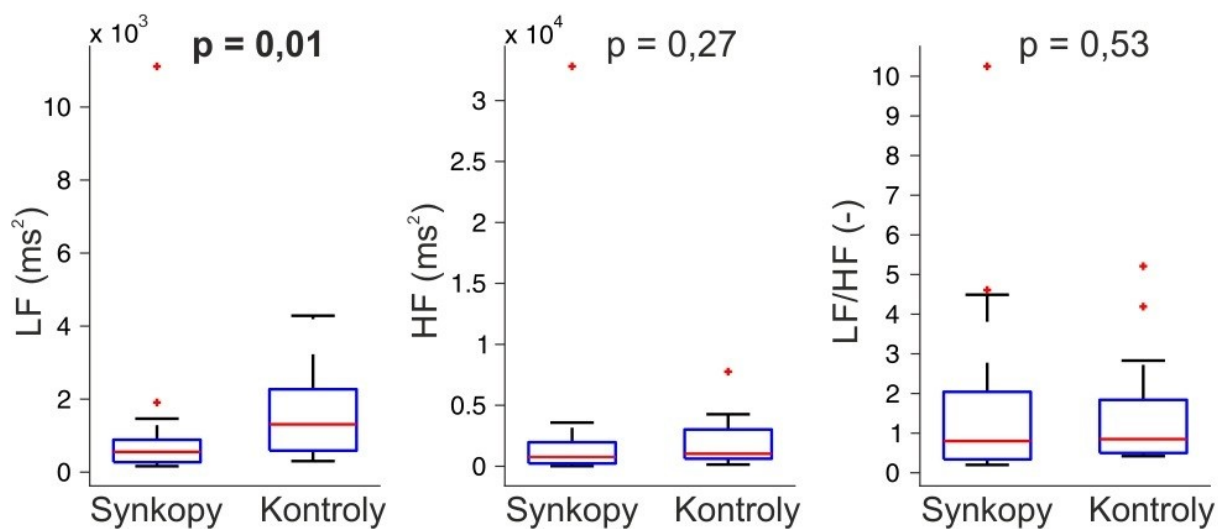
Obrázek 8 – Rozložení parametrů časové analýzy mezi skupinou synkop a kontrol v průběhu fáze lehu



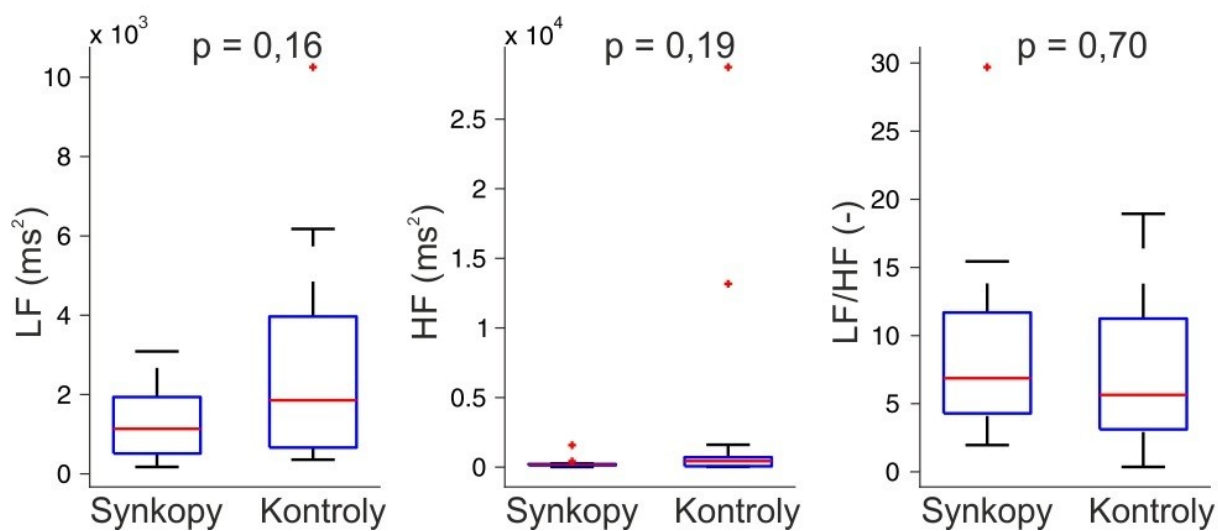


Obrázek 9 – Rozložení parametrů časové analýzy mezi skupinou synkop a kontrol v průběhu fáze stoje

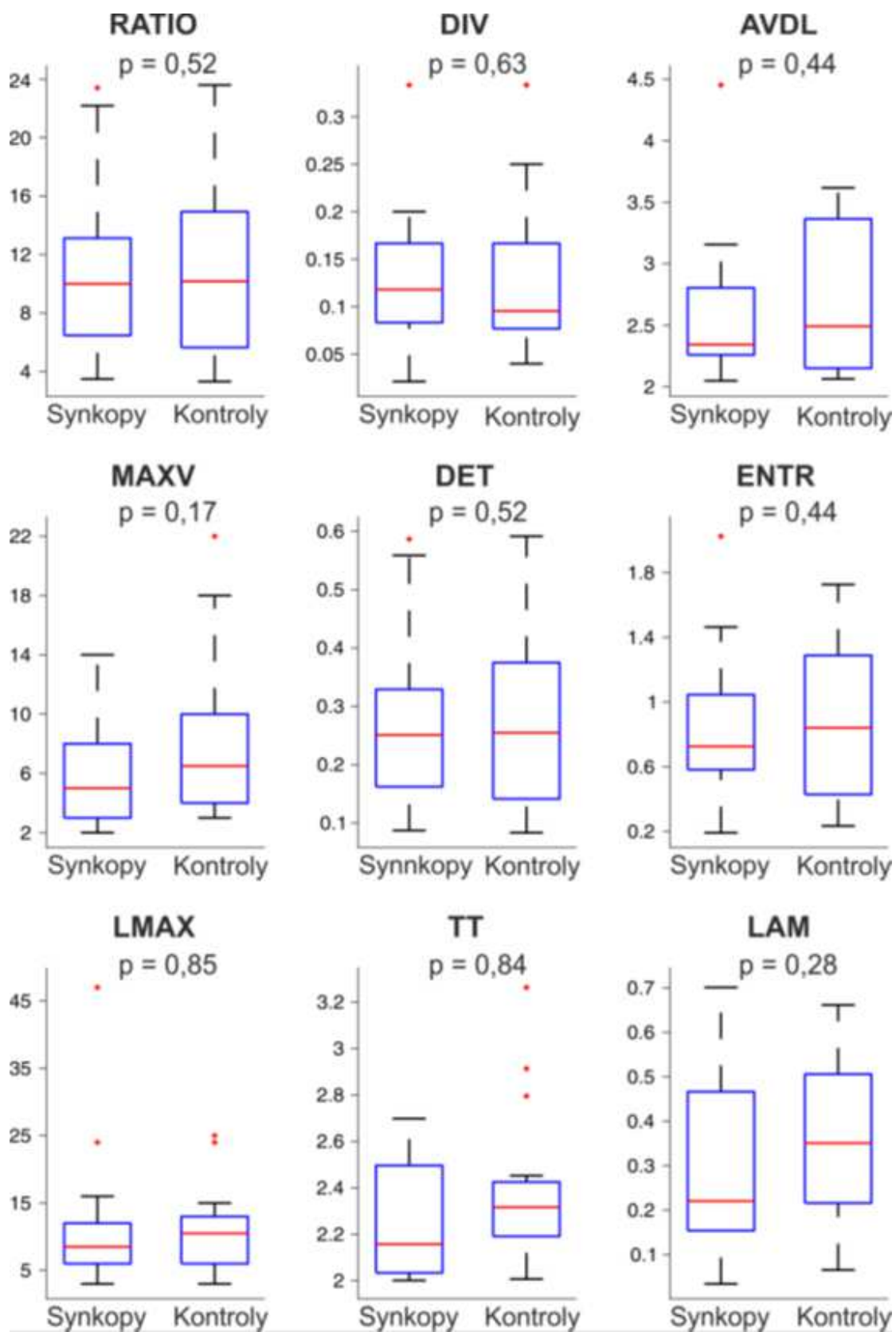
## Fáze1



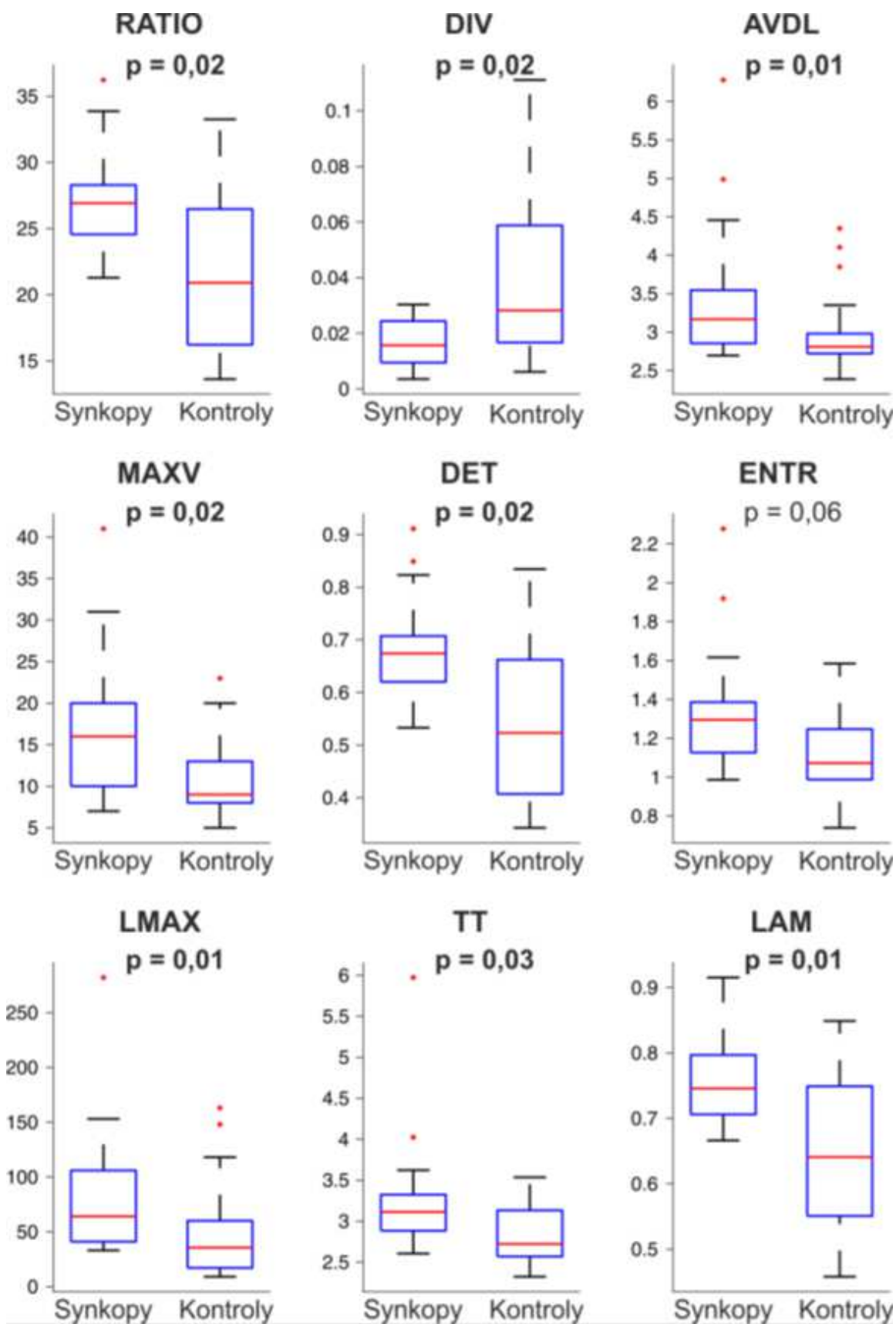
## Fáze 2



Obrázek 10 – Rozložení parametrů frekvenční analýzy mezi skupinou synkop a kontrol v průběhu fáze lehu (fáze 1) a stoje (fáze 2)



Obrázek 11 – Rozložení parametrů rekurentní analýzy mezi skupinou synkop a kontrol ve fázi lehu



Obrázek 12 – Rozložení parametrů rekurentní analýzy mezi skupinou synkop a kontrol ve fázi stoje

### 7.1.3. Diskuze

V posledních letech se v medicíně zvyšuje využití nelineárních metod odvozených z teorie chaosu (Marwan *et al.*, 2007; Trauth, Sillmann, 2012; Petkovic, Cojbasic, 2012). Ty jsou schopné popsat chování dynamických systémů (Sharma, 2009). Nelineární metody umožňují dle některých autorů popsat průběh určitých procesů v organismu přesněji než spektrum jiných metod, které jsou momentálně využívány (Silipo *et al.*, 1998). Každý živý organismus vykazuje známky chaotického chování od úrovně buňky po regulaci vitálních funkcí jako je srdeční frekvence a krevní tlak (Sharma, 2009).

Za fyziologických podmínek je optimální regulace srdeční frekvence zajištěna vyváženou aktivací sympatiku a parasympatiku tak, aby bylo zamezeno výskytu patologických stavů. Autonomní nervový systém v rámci adaptace na danou situaci vede skrze změnu aktivity sympatiku a parasympatiku k významné odchylce délky R-R intervalů (ovlivňuje srdeční frekvenci). V případě vazovagální synkopy je porušena funkce autonomního nervového systému (snížená aktivita sympatiku), což vede k nedostatečnému zvýšení srdeční frekvence, hypotenzi, hypoperfuzi mozku a v konečném důsledku k synkopě. Adaptabilita autonomního nervového systému a variabilita srdeční frekvence je snížena.

V naší studii jsme se zaměřili na hodnocení variability srdeční frekvence a identifikaci autonomní dysfunkce u pacientů s vazovagální synkopou. Je třeba zmínit, že oproti kontrolní skupině byly v synkopové skupině ve větší míře zastoupeny ženy. Nepředpokládali jsme však, že by tento fakt měl výrazným způsobem ovlivnit výsledky studie, neboť dle studie Pietruchy a kol. z roku 2009 jsou vazovagální synkopy diagnostikovány ve srovnatelném poměru u mužů i žen a nebyly prokázány signifikantní vztahy mezi pohlavím a výsledky ortostatického testu (Pietrucha *et al.*, 2009). Taktéž normativní studie Vlčkové a kol. zaměřená na frekvenční analýzu HRV neprokázala signifikantní rozdíly hodnot jednotlivých parametrů spektrálních výkonů (LF, HF, total power) mezi muži a ženami (Vlčková *et al.*, 2010). Zahraniční práce Muraty a kol. také neprokázala signifikantní vliv pohlaví na hodnoty parametrů časové a frekvenční analýzy HRV (Murata *et al.*, 1992).

K hodnocení HRV jsme využili záznam sekvencí R-R intervalů v průběhu 5 minutové fáze lehu a 5 minutové fáze stoje. Záznam sekvence R-R intervalů byl následně hodnocen jak časovou a frekvenční analýzou (klasickými lineárními metodami), tak rekurentní analýzou (jednou z nelineárních metod odvozenou z teorie chaosu).

Ve fázi klidného lehu nebylo nalezeno mnoho významných rozdílů mezi parametry časové, frekvenční a rekurentní analýzy HRV. Tyto nálezy nejsou překvapivé, neboť nebylo

prokázáno, že by se v průběhu lehu aktivita autonomního nervového systému mezi populací zdravých a pacientů s vazovagální synkopou významně lišila (*Forleo et al., 2013*).

Časová analýza HRV ukázala signifikantní rozdíly většiny parametrů mezi skupinami ve fázi stoje. Tyto výsledky korespondují s již dříve publikovanou studií Lagiho a kol. (*Lagi et al., 1997*). Na druhou stranu výsledky frekvenční analýzy HRV neukázaly ve fázi stoje žádné významné rozdíly mezi skupinami. Naše výsledky tedy nemohou potvrdit tvrzení Kochiadikise a kol., že je spektrální analýza HRV schopna identifikovat rozdíly v aktivaci autonomního nervového systému v ortostáze mezi pacienty s vazovagální synkopou a zdravými kontrolami (*Kochiadakis et al., 1997; Kochiadakis et al., 1998*). Domníváme se, že by důvodem pro naše nálezy mohla být významná interindividuální variabilita hodnot parametrů spektrální analýzy (*Vlckova et al., 2010*), která může výsledky výrazně zkreslit.

Naše pilotní studie ukázala ve fázi stoje signifikantní rozdíly většiny parametrů rekurentní analýzy HRV mezi skupinou pacientů s vazovagální synkopou a zdravými kontrolami. Ve skupině synkop byly prokázány signifikantně vyšší hodnoty parametrů DET, LAM, MAXV, TT, AVDL, RATIO, LMAX a nižší hodnoty DIV. Tyto nálezy reflektují vyšší výskyt opakujících se (rekurentních) stavů srdeční frekvence ve fázi stoje. Zvýšení DET obecně poukazuje na častější návrat systému k předchozím stavům (*Javorka et al., 2008*). Vyšší hodnoty LAM odráží vyšší výskyt neměnných či velmi pomalu se měnících (laminárních) stavů a vyšší předvídatelnost systému. Parametry VMAX a TT reprezentují vertikální čáry v rekurentním grafu (nejdelší a průměrná délka čáry) a představují tak časový úsek trvání určitého stavu v systému (*Silipo et al., 1998*). Zvýšení hodnot VMAX a TT u pacientů trpících vazovagální synkopou může ukazovat, že se srdeční frekvence sinusového rytmu ve fázi stoje mění oproti předchozím stavům málo. Průměrná délka diagonálních čar AVDL zobrazuje stav, kdy trajektorie ve fázovém prostoru vede paralelně k jinému segmentu fázového prostoru, je také nazývána střední dobou predikce (*Marwan et al., 2002*). Vyšší hodnota AVDL znamená tedy vyšší předvídatelnost systému (*Schinkel et al., 2009*). Významné rozdíly hodnot výše uvedených parametrů rekurentní analýzy HRV tak odráží u jedinců s vazovagální synkopou nižší variabilitu srdeční frekvence po vertikalizaci oproti zdravým kontrolám.

Naše výsledky naznačují, že by rekurentní analýza HRV mohla být využívána k identifikaci autonomní dysfunkce u pacientů s vazovagální synkopou a to s potenciálně vyšší sensitivitou než spektrální (frekvenční) analýza HRV. Nicméně k ověření těchto závěrů by bylo zapotřebí provést měření u větší skupiny pacientů.

## **7.2.Rekurentní analýza HRV u pacientů s diabetickou autonomní neuropatií**

### **7.2.1. Metodika práce**

#### **7.2.1.1. Studovaný soubor**

Do studie zaměřené na zhodnocení možnosti využití rekurentní analýzy variability srdeční frekvence k popisu autonomní dysfunkce u pacientů s diabetickou autonomní neuropatií bylo zavzato 81 probandů rozdělených do 2 skupin. Do první vyšetřované skupiny bylo zařazeno 36 diabetiků 1. a 2. typu s prokázanou kardiovaskulární autonomní neuropatií. Ve skupině trpící KAN bylo přítomno 17 žen a 19 mužů (průměrný věk 51 let  $\pm$  13 let). Do kontrolní skupiny bylo zařazeno 45 zdravých probandů, 22 žen a 23 mužů (průměrný věk 53 let  $\pm$  11 let). Kontrolní skupina pacientů se skládala ze zdravých dobrovolníků bez diabetes mellitus, thyreopatie či známé nediabetické neuropatie. Do studie nebyli zařazováni pacienti s anamnézou nádorového onemocnění a jedinci s akutním infekčním onemocněním.

Každý účastník studie byl pečlivě obeznámen se všemi plánovanými vyšetřeními a účelem studie a svůj souhlas s účastí ve studii stvrdil podpisem informovaného souhlasu. Studie byla schválena Etickou komisí FN Motol. Vyšetření probíhala v letech 2012-2015.

#### **7.2.1.2. Vyšetření variability srdeční frekvence**

Všichni probandi podstoupili v Neurofyzilogické laboratoři FN Motol vyšetření variability srdeční frekvence (HRV) dle doporučení Evropské Kardiologické společnosti (*Malik et al., 1996*). Vyšetření bylo provedeno za standardizovaných podmínek (v klidné místnosti, mezi 7. a 12. hodinou dopoledne, nalačno či 2 hodiny od posledního jídla, za splnění podmínek absence akutní infekce a hypoglykémie, 24-hodinové vysazení beta-blokátorů, antidepresiv a diuretik) zařízením FAN (výrobce Schwarzer, Německo). Byly vyhodnocovány 4 parametry kardiovaskulárních autonomních reflexních testů a 3 parametry spektrální analýzy variability srdeční frekvence. Prováděn byl test hlubokého dýchání s kontrolovanou frekvencí 6 dechů za minutu, v němž byl sledován parametr E:I ratio. Dále byl prováděn test Valsalvova manévru proti definovanému odporu vzduchu 40mmHg, ve kterém bylo vyhodnocováno Valsalva ratio. Z průběhu testu ortostatického (5 minut leh, 5 minut stoj) byly získány parametry Ewing 30:15 a ortostatický pokles systolického krevního tlaku. Výše zmíněné parametry byly srovnávány s věkově závislými normami (*Lacigová et al., 2016*).

V rámci spektrální analýzy variability srdeční frekvence byly hodnoceny parametry spektrálních výkonů nízkých frekvencí (LF) o rozsahu 0,04-0,15 Hz, vysokých frekvencí (HF) o rozsahu 0,15-0,40Hz a celkový spektrální výkon (TP). Získané hodnoty spektrálních výkonů během ortostatického testu byly srovnávány s normativními daty pro českou populaci (Vlčková *et al.*, 2010). Přítomnost kardiální autonomní neuropatie byla potvrzena při patologii 2 a více parametrů.

### 7.2.1.3. Rekurentní analýza HRV

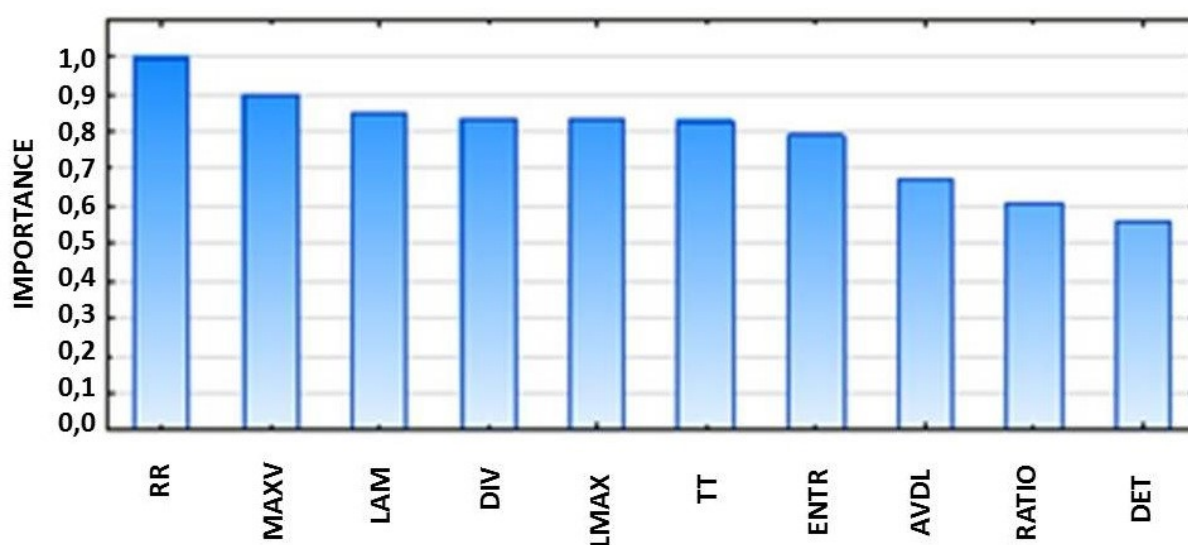
Softwarově byly z EKG záznamů v průběhu jednotlivých testů získány sekvence po sobě jdoucích srdečních stahů neboli R-R intervalů. Rekurentní analýza variability srdeční frekvence byla vypočítána ze záznamů R-R intervalů testu hlubokého dýchání. Pro analýzu testu hlubokého dýchání jsme se rozhodli proto, neboť parametr E:I ratio vykazoval patologii u největšího počtu pacientů trpících diabetickou autonomní neuropatií (viz Tabulka 9). V rámci rekurentní analýzy byly vypočítány parametry RR, DET, LAM, TT, MAXV, AVDL, LMAX, DIV, ENTR, RATIO. Detailnější popis výpočtu rekurentní analýzy je uveden v odstavci 7.1.1.3.3 této dizertační práce.

<b>Tabulka 9 - Souhrn výsledků testování HRV standardními metodami</b>			
Test	Sledovaný parametr	Počet patologických nálezů pro jednotlivé skupiny	
		Diabetici trpící KAN (n=36)	Zdravé kontroly (n=45)
Test hlubokého dýchání	E:I ratio	30	0
Valsalvův manévr	Valsalva ratio	18	0
Polohový test	Ewing 30:15	16	0
	Pokles tlaku v ortostáze	8	0
Spektrální analýza HRV	LF	17	0
	HF	24	0
	TP	24	0



#### 7.2.1.4. Statistická analýza

Pro správnou diagnostiku patologického stavu je zásadní použití testu s co nejvyšší senzitivitou a specificitou. K zjištění optimálního parametru proto byla na vypočítané parametry rekurentní analýzy HRV použita metoda klasifikačních a regresních stromů. Při této analýze bylo použito 70% dat k natrénování a 30% dat k testování. Výsledkem analýzy byla importance (pořadí důležitosti pro klasifikaci) jednotlivých parametrů rekurentní analýzy HRV z testu hlubokého dýchání ke klasifikaci jedinců zdravých a trpících kardiální autonomní neuropatií (viz Obrázek 13).



Obrázek 13 – Importance parametrů rekurentní analýzy pro klasifikační strom k odlišení jedinců zdravých a trpících KAN

#### 7.2.2. Výsledky

U všech pacientů s diabetes mellitus trpících KAN (n=36) byla prokázána patologie minimálně 2 ze 7 parametrů kardiovaskulárních reflexních testů. Nejčastěji (u 30 pacientů) byla detekována patologická hodnota parametru E:I ratio v testu hlubokého dýchání. U 24 pacientů byly zaznamenány abnormální hodnoty parametrů HF a TP ze spektrální analýzy HRV. Dále byla nalezena patologie v parametrech Valsalva ratio (u 18 pacientů), LF (u 17 pacientů), Ewing 30:15 (u 16 pacientů). Nejméně často detekovatelná byla ortostatická hypotenze (u 8 pacientů). Všechny zdravé kontroly měly normální výsledky kardiovaskulárních reflexních testů. (viz Tabulka 9)

Analýza importance jednotlivých parametrů rekurentní analýzy ukázala, že pro odlišení skupin jedinců zdravých a jedinců s KAN má největší význam hodnocení parametru RR (vypovídá o pravděpodobnosti, že se konkrétní stav bude opakovat) a MAXV (nejdelší setrvání v konkrétním stavu). Souhrn importance parametrů rekurentní analýzy HRV z testu hlubokého dýchání je zobrazen na Obrázku 13. Analýza klasifikačních stromů dále prokázala, že při použití nejcitlivějších parametrů rekurentní analýzy HRV je možné v 5-ti uzlovém klasifikačním stromě rozdělit jedince na zdravé a trpící KAN s přesností 80% za senzitivity 76,9% a specificity 82,4%.

Při použití vzorce výpočtu senzitivity ( $\text{počet skutečně pozitivních} / \{\text{počet skutečně pozitivních} + \text{počet falešně negativních}\}$ ) pro diagnostiku KAN byla v naší skupině diabetiků senzitivita standardně prováděných měření nejvyšší při hodnocení parametru časové analýzy HRV testu hlubokého dýchání (83,3%). Senzitivita všech ostatních parametrů klasicky používaných metod byla nižší. Senzitivita parametrů frekvenční analýzy pro vysoké frekvence a celkový spektrální výkon činila 66,7%, pro nízké frekvence 47,2%. Valsalva ratio měl senzitivitu 50%, Ewing 30:15 44,4%, ortostatická hypotenze 22,2%. Vzhledem k tomu, že zdraví probandi měli normální výsledky kardiovaskulárních reflexních testů, pro naši kohortu by vyšla specificita ( $\text{počet skutečně negativních} / \{\text{počet skutečně negativních} + \text{počet falešně pozitivních}\}$ ) výše zmíněných testů 100%.

### 7.2.3. Diskuze

Je známo, že kardiální autonomní neuropatie a snížená variabilita srdeční frekvence představují negativní prognostický marker, neboť jsou asociovány s vyšší kardiovaskulární morbiditou a mortalitou (*Vinik et al., 2007; Sharma 2009*). Hodnocení HRV umožňuje identifikovat pacienty ve vyšším kardiovaskulárním riziku. Standardní metodu měření HRV představuje v současné době hodnocení parametrů kardiovaskulárních reflexních testů.

Standardní parametry HRV jsou vypočítávány klasickými lineárními metodami (časovou a frekvenční analýzou). Na vzniku HRV se však podílejí i jevy nelineární. Jsou podmíněny komplexními interakcemi hemodynamických, elektrofyziologických a humorálních proměnných stejně jako autonomní a centrální nervovou regulací (*Malik et al., 1996*). Někteří autoři spekulují, že nelineární metody analýzy by mohly poskytnout cenné informace ve fyziologii vzniku HRV (*Silipo et al., 1998*). Přestože nebyla doposud provedena

systematická studie s použitím nelineárních metod na velké kohortě pacientů, představují nelineární metody potenciální nástroj pro hodnocení HRV (*Malik et al., 1996*).

K provedení standardních měření je zapotřebí nezbytné hardwarové i softwarové vybavení a zaučený personál, provedení vyšetření včetně zhodnocení HRV zabere více jak 30 minut. Naším cílem bylo pokusit se nalézt jednoduše a rychle proveditelný test, který by s uspokojivě vysokou senzitivitou a specificitou umožnil diagnostikovat diabetickou autonomní neuropatii. Vzhledem k tomu, že se rekurentní analýza HRV jeví jako slibná metoda pro hodnocení změn HRV (*Javorka et al., 2008; Schlenker et al., 2014; Schlenker et al., 2016*), rozhodli jsme se otestovat její senzitivitu a specificitu pro diagnostiku diabetické kardiální autonomní neuropatie. Provedli jsme rekurentní analýzu HRV z průběhu testu hlubokého dýchání. Tento test jsme zvolili z několika důvodů. Je velmi jednoduše proveditelný, trvá pouhé 2 minuty a detekuje časné postižení parasympatiku u pacientů s diabetes mellitus s nejvyšší senzitivitou ze všech kardiovaskulárních reflexních testů (*Sukla et al., 2016*). I v naší kohortě diabetiků měl test hlubokého dýchání nejvyšší senzitivitu pro diagnostiku KAN (83%).

Po provedení rekurentní analýzy HRV z testu hlubokého dýchání byly pro diagnostiku KAN určeny nejcitlivější parametry rekurentní analýzy za pomoci metody klasifikačních a regresních stromů. V 5-ti uzlovém klasifikačním stromě bylo pak možné rozdělit jedince na zdravé a trpící KAN za použití parametrů rekurentní analýzy s přesností 80% za senzitivity 76,9% a specificity 82,4%. Rekurentní analýza HRV z testu hlubokého dýchání měla tedy nižší senzitivitu oproti klasicky využívané časové analýze HRV testu hlubokého dýchání. Rekurentní analýza HRV z testu hlubokého dýchání vykazala však vyšší senzitivitu než spektrální (frekvenční) analýza HRV z testu ortostatického, Valsalva ratio, Ewing 30:15 a ortostatická hypotenze. Rekurentní analýza HRV testu hlubokého dýchání měla nižší specificitu než klasicky používané metody časové a frekvenční analýzy. Je však potřeba mít na mysli, že rekurentní analýza HRV nemá stanoveny věkově závislé populační normy jako standardně využívané testy. Diskriminace hodnot parametrů rekurentní analýzy k odlišení probandů s autonomní neuropatií a bez autonomní neuropatie probíhala pomocí metody klasifikačního stromu, který byl natrénován ze 70% námi naměřených dat (tedy z několika desítek hodnot). Zvětšení studovaného souboru by mohlo zvýšit přesnost diagnostiky autonomní neuropatie za pomoci parametrů rekurentní analýzy HRV.

Naše výsledky jsou též ovlivněny výběrem studovaného souboru (pouze zdraví versus diabetici s KAN), nezapočítává se vliv výsledků měření u diabetiků bez KAN. Skupinu

diabetiků bez KAN jsme však do naší kohorty nezařadili z důvodu jasné diskriminace probandů s a bez autonomní neuropatie.

I při zohlednění limitací naší studie se rekurentní analýza HRV zdá být metodou použitelnou pro diagnostiku autonomní dysfunkce u pacientů s diabetes mellitus. Tento závěr podporuje i práce z roku 2008 (*Javorka et al., 2008*), která prokázala signifikantní změny parametrů rekurentní analýzy HRV u mladých asymptomatických diabetiků 1. typu v porovnání se zdravými kontrolami. I naše výsledky nasvědčují tomu, že by mělo smysl přidat rekurentní analýzu HRV k standardně využívaným lineárním parametrům HRV pro lepší popis dysregulace srdeční frekvence u diabetických pacientů.

## 8. Závěry

### **1.) Prokázali jsme signifikantní vazbu mezi přítomností kardiální autonomní neuropatie a karotickou intimomediální šířkou u pacientů s diabetes mellitus 1. typu.**

Při započítání nejvýznamnějších rizikových faktorů aterosklerózy byl prokázán signifikantní vliv pohlaví, věku, BMI, přítomnosti diabetes mellitus 1. typu a kardiální autonomní neuropatie na IMT CCA. Prokázána byla signifikantní interakce přítomnosti diabetes mellitus 1. typu a KAN na IMT CCA. Výsledky potvrzují první navrhovanou hypotézu.

### **2.) Neprokázali jsme signifikantní vazbu mezi přítomností kardiální autonomní neuropatie a karotickou intimomediální šířkou u pacientů s diabetes mellitus 2. typu.**

Při započítání nejvýznamnějších rizikových faktorů aterosklerózy byl prokázán signifikantní vliv pohlaví, věku, délky trvání diabetes mellitus 2. typu a hladiny TAG na IMT CCA. Přestože byla karotická intimomediální šířka u diabetiků 2. typu trpících KAN v modelovaných odhadech vyšší, neprokázali jsme u této skupiny pacientů, že by byl efekt přítomnosti KAN na IMT CCA signifikantní. Předpokládáme, že tento výsledek byl podmíněn menším počtem námi vyšetřených probandů ve skupině diabetiků 2. typu. Naše výsledky nepotvrzují druhou navrhovanou hypotézu.

### **3.) Parametry rekurentní analýzy variability srdeční frekvence vykazují signifikantní rozdíly mezi skupinou pacientů s vazovagálními synkopami a zdravými kontrolami.**

U zdravých probandů a pacientů s vazovagálními synkopami jsme provedli časovou, frekvenční a rekurentní analýzu variability srdeční frekvence v průběhu 5 minut trvajícího lehu a stoje. Ve fázi lehu nebylo nalezeno mnoho významných rozdílů mezi parametry časové, frekvenční a rekurentní analýzy HRV. Ve fázi stoje jsme prokázali signifikantní rozdíly většiny parametrů časové a rekurentní analýzy HRV. Ve skupině synkop byly prokázány signifikantně vyšší hodnoty rekurentních parametrů DET, LAM, MAXV, TT, AVDL, RATIO, LMAX a nižší hodnoty DIV. Tyto nálezy odráží

nižší variabilitu srdeční frekvence ve fázi stoje u pacientů se synkopami. Tyto výsledky potvrzují třetí navrhovanou hypotézu.

#### **4.) Parametry rekurentní analýzy variability srdeční frekvence by bylo možné využít k diagnostice autonomní dysfunkce u pacientů s diabetes mellitus.**

U diabetiků 1. a 2. typu s prokázanou kardiální autonomní neuropatií a zdravých probandů jsme provedli standardní hodnocení variability srdeční frekvence za pomoci časové a frekvenční analýzy. Provedli jsme výpočet rekurentní analýzy HRV testu hlubokého dýchání a metodou klasifikačních a regresních stromů jsme určili nejcitlivější parametry rekurentní analýzy k diagnostice autonomní dysfunkce u diabetických pacientů. V námi modelovaném klasifikačním stromě jsme prokázali, že by bylo možné použitím parametrů rekurentní analýzy HRV diagnostikovat autonomní neuropatii s přesností 80% za senzitivity 76,9% a specificity 82,4%. Naše výsledky podporují čtvrtou navrhovanou hypotézu.

### **Význam výsledků naší studie pro klinickou praxi**

Kardiální autonomní neuropatie je častou a závažnou komplikací diabetes mellitus, která je asociována s výrazně vyšší kardiovaskulární morbiditou a mortalitou. Výsledky naší studie nasvědčují, že se diabetická kardiální autonomní neuropatie může podílet na rozvoji aterosklerotického postižení cév. Proto je z našeho pohledu u pacientů trpících kardiální autonomní neuropatií obzvláště důležitý screening asymptomatické aterosklerózy, důsledná edukace pacienta a intervence rizikových faktorů s cílem zpomalení nepříznivého vývoje onemocnění a zvrácení trvalého poškození životně důležitých orgánů.

Zároveň výsledky naší práce zabývající se diagnostikou autonomní dysfunkce svědčí pro to, že by přidání parametrů rekurentní analýzy variability srdeční frekvence mohlo zlepšit diagnostiku kardiální autonomní neuropatie.

## 9. Souhrn

### **Abstrakt:**

Hlavním cílem naší práce bylo zhodnotit vztah kardiální autonomní neuropatie (KAN) a intimomediální šíře (IMT) karotických tepen u pacientů s diabetes mellitus. Vyšetřovali jsme dospělé pacienty s diabetes mellitus 1. a 2. typu a zdravé nediabetické kontroly. U všech probandů jsme provedli zhodnocení anamnestických, antropometrických a biochemických markerů, sonografické měření IMT a vyšetření variability srdeční frekvence (HRV). Pro statistickou analýzu byl použit model semiparametrické logistické regrese ze třídy zobecněných aditivních modelů. I po započítání rizikových faktorů aterosklerózy jsme prokázali signifikantní vliv přítomnosti KAN na hodnoty IMT u diabetiků 1. typu. U diabetiků 2. typu trpících KAN byly modelované hodnoty IMT také vyšší, efekt přítomnosti KAN na IMT však nebyl signifikantní. Prokázána byla interakce efektů přítomnosti KAN a diabetes mellitus k hodnotám IMT. Prokázána byla také interakce efektů KAN s věkem a KAN s BMI. V našem modelování byl v KAN pozitivních skupinách nárůst IMT se zvyšujícím se věkem a BMI rychlejší. Výsledky naznačují, že by v patogenezi aterosklerózy pacientů s diabetes mellitus mohla hrát roli KAN.

Sekundárním cílem bylo zhodnocení využití rekurentní analýzy variability srdeční frekvence k diagnostice autonomní dysfunkce. Mezi skupinou pacientů s vazovagálními synkopami a zdravými kontrolami jsme prokázali ve fázi stoje ortostatického testu signifikantní rozdíly většiny parametrů rekurentní analýzy HRV. Dále byla provedena rekurentní analýza HRV u skupiny diabetiků trpících KAN a zdravých kontrol. Metodou klasifikačních stromů jsme určili nejcitlivější parametry rekurentní analýzy a prokázali, že by jejich použitím bylo možné diagnostikovat KAN s přesností 80% za senzitivity 76,9% a specificity 82,4%.

**Klíčová slova:** *diabetes mellitus 1. typu, diabetes mellitus 2. typu, autonomní neuropatie, IMT, ateroskleróza, rekurentní analýza HRV*

### **Abstract:**

The study aims to evaluate the relationship between cardiac autonomic neuropathy (CAN) and intima-media thickness (IMT) of carotid arteries in patients with diabetes mellitus. Individuals with type 1 and type 2 diabetes mellitus were included, with non-diabetic controls. Medical history, anthropometric and biochemical data, IMT measurements and heart-rate-variability (HRV) analysis in all probands were evaluated. A model of semiparametric logistic regression from the class of generalized additive models was used for statistical analysis. CAN demonstrated significant increasing effects on IMT values in type 1 diabetes patients. The model showed greater IMT values in type 2 diabetes mellitus patients suffering from CAN, but the effect of CAN was not significant. The interaction of CAN and diabetes mellitus effects on IMT values was proven. The interactions of CAN and age, CAN and BMI were also demonstrated. In CAN positive groups, IMT values increased more quickly with greater age and BMI. The results suggest that CAN may play a role in the pathogenesis of atherosclerosis in patients with diabetes mellitus.

The secondary objective was to evaluate the usage of the recurrence quantification analysis of HRV in CAN diagnostics. Between the group of healthy individuals and patients with vasovagal syncope, during the standing phase of the orthostatic test, significant differences in most recurrence parameters of HRV analysis were demonstrated. HRV recurrence analysis was also performed in patients with type 1 and type 2 DM, with healthy controls. Determination and proof of the most sensitive parameters of HRV recurrence analysis that can be used for CAN diagnosis were done, exhibiting an accuracy of 80%, with a sensitivity of 76,9%, and a specificity of 82,4%.

**Key words:** *type 1 diabetes mellitus, type 2 diabetes mellitus, autonomic neuropathy, IMT, atherosclerosis, recurrence quantification analysis of HRV*



## 10. Seznam použitých zkratk

AGEs = advanced glycation endproducts (pokročilé produkty glykace)

AI = aterogenní index

Anti-GAD = glutamic acid decarboxylase antibodies (protilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutamové)

Anti-IA2 = islet antigen 2 antibodies (protilátky proti ostrůvkové tyrozinkináze)

ATP = adenosintrifosfát

AVDL = průměrná délka diagonálních čar

BMI = body mass index

cAMP = cyklický adenosinmonofosfát

CAN = cardiac autonomic neuropathy

CCA = common carotid artery (společná krkavice)

Cl = chloridy

CRP = C-reaktivní protein

ČR = Česká republika

DAG = diacylglycerol

DAN = diabetická autonomní neuropatie

DCCT = Diabetes Control and Complication Trial

DET = determinismus

DIV = divergence

DM = diabetes mellitus

DM1 = diabetes mellitus 1.typu

DM2 = diabetes mellitus 2.typu

dTk = diastolický tlak krve

E:I ratio = expiration : inspiration ratio (poměr výdech : nádech)

ENTR = entropic

FGF= fibroblast growth factor (fibroblastový růstový faktor)

FN = fakultní nemocnice

fT4 = free thyroxine (volná frakce thyroxinu)

GAM = generalized additive models (zobecněné aditivní modely)

GFAT = glutamin:fruktóza-6-fosfát aminotransferáza

GLP = glucagon-like peptid (glukagonu podobný peptid)

GLUT = glukózový transportér

HbA1c = glykovaný hemoglobin

HDL-cholesterol = high density lipoprotein cholesterol (lipoprotein s vysokou hustotou)

HF = high frequencies (vysoké frekvence)

HR = heart rate (srdeční frekvence)

HRV = heart rate variability (variabilita srdeční frekvence)

IAA = insulin autoantibodies (protilátky proti inzulinu)

IL-6 = interleukin 6

IMT = intima-media thickness (intimomediální šíře)

IR = inzulinový receptor

IRS = substrát inzulinového receptoru

K = kalium

KAN = kardiální autonomní neuropatie

LAM = laminarita

LDL-cholesterol = low density lipoprotein cholesterol (lipoprotein s nízkou hustotou)

LF = low frequencies (nízké frekvence)

LMAX = nejdelší diagonální čára

MAPK = mitogen-activated protein kinase (mitogenem aktivovaná proteinkináza)

MAU = mikroalbuminurie

MAXV = nejdelší vertikální čára

MDRD = Modification of Diet in Renal Disease

mRNA = messenger ribonucleic acid (mediátorová ribonukleová kyselina)

ms = milisekunda

n.vagus = nervus vagus

Na = natrium

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPáza = sodíko-draslíková adenosintrifosfatáza

NAD(P)/NAD(P)H = nikotinamidadenindinukleotid(fosfát), H=redukovaná forma

NN50 = počet R-R intervalů, které se od sebe liší o více než 50 ms

NO = oxid dusnatý

PI3 = fosfatidylinositol-3

pNN50 = procentuální zastoupení NN50 z celkového počtu R-R intervalů

RAGE = receptor pro AGEs

RMSSD = druhá odmocnina průměru čtverců odchylek po sobě následujících normálních R-R intervalů

ROS = reactive oxygen species (reaktivní formy kyslíku)

RR = procento rekurentních bodů

SDNN = směrodatná odchylka po sobě následujících normálních R-R intervalů

SDHR = směrodatná odchylka srdeční frekvence

sTk = systolický tlak krve

TAG = triacylglyceroly

TCF7L2 = transcription factor 7-like 2 (transkripční faktor 7)

TNF  $\alpha$  = tumor necrosis faktor alfa

TP = total power (celkový spektrální výkon)

TSH = thyreoideu stimulující hormon

TT = rekurentní čas

VLDL = very low density lipoprotein (lipoprotein o velmi nízké hustotě)

WBCC = white blood cell count (počet bílých krvinek)

## 11. Referenční seznam

1. ADIELS, Martin, Sven-Olof OLOFSSON, Marja-Riitta TASKINEN a Jan BORÉN, 2008. Overproduction of Very Low-Density Lipoproteins Is the Hallmark of the Dyslipidemia in the Metabolic Syndrome. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. **28**(7), 1225-1236. DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.160192. ISSN 1079-5642. Dostupné také z: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/ATVBAHA.107.160192>
2. ACHARYA, U., S. SREE, S. CHATTOPADHYAY, W. YU a P. ANG, 2011. APPLICATION OF RECURRENCE QUANTIFICATION ANALYSIS FOR THE AUTOMATED IDENTIFICATION OF EPILEPTIC EEG SIGNALS. *International Journal of Neural Systems*. **21**(03), 199-211. DOI: 10.1142/S0129065711002808. ISSN 0129-0657. Dostupné také z: <https://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/S0129065711002808>
3. ALBERTI, K. G. M. M., P. ZIMMET a J. SHAW, 2006. Metabolic syndrome-a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabetic Medicine*. **23**(5), 469-480. ISSN 0742-3071. Dostupné také z: <https://onlinelibrary-wiley-com.ezproxy.is.cuni.cz/doi/full/10.1111/j.1464-5491.2006.01858.x>
4. AMBROSE, John A. a Rajat S. BARUA, 2004. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease. *Journal of the American College of Cardiology*. **43**(10), 1731-1737. DOI: 10.1016/j.jacc.2003.12.047. ISSN 07351097. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0735109704004346>
5. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 1989. Consensus Statement: Role of cardiovascular risk factors in prevention and treatment of macrovascular disease in diabetes. *Diabetes Care*. **12**(8), 573-579. DOI: 10.2337/diacare.12.8.573. ISSN 0149-5992. Dostupné také z: <http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/diacare.12.8.573>
6. ARONSON, D. a EJ. RAYFIELD, 2002. How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms. *Cardiovascular diabetology*. **8**(1), 1.

7. BAGHERZADEH, Ataollah, Afshin NEJATI-AFKHAM, Yaser TAJALLIZADE-KHOOB, et al., 2013. Association of cardiac autonomic neuropathy with arterial stiffness in type 2 diabetes mellitus patients. *Journal of diabetes and metabolic disorders*. **12**(1), 55. DOI: 10.1186/2251-6581-12-55. ISSN 2251-6581. Dostupné také z: <http://jdmdonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/2251-6581-12-55>
8. BAKRIS, G., 1995. Pathogenesis of hypertension in diabetes. *Diabetes Reviews*. **3**, 460-474.
9. BECKMAN, Joshua A., Mark A. CREAGER a Peter LIBBY, 2002. Diabetes and Atherosclerosis. *JAMA*. **287**(19), 2570-81. DOI: 10.1001/jama.287.19.2570. ISSN 0098-7484. Dostupné také z: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.287.19.2570>
10. BISSINGER, Andrzej, 2017. Cardiac Autonomic Neuropathy: Why Should Cardiologists Care about That?. *Journal of Diabetes Research*. **2017**, 1-9. DOI: 10.1155/2017/5374176. ISSN 2314-6745. Dostupné také z: <https://www.hindawi.com/journals/jdr/2017/5374176/>
11. BORNFELDT, Karin E. a Ira TABAS, 2011. Insulin Resistance, Hyperglycemia, and Atherosclerosis. *Cell Metabolism*. **14**(5), 575-585. DOI: 10.1016/j.cmet.2011.07.015. ISSN 15504131. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413111003871>
12. BOROVIKOVA, Lyudmila V., Svetlana IVANOVA, Minghuang ZHANG, et al., 2000. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*. **405**(6785), 458-462. DOI: 10.1038/35013070. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/35013070>
13. BROWNLEE, M., 1995. The pathological implications of protein glycation. *Clin. Invest. Med*. **18**, 275-81.
14. BROWNLEE, Michael, 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. **414**(6865), 813-820. DOI: 10.1038/414813a. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/414813a>

15. BURSOVA, S., E. VLCKOVA, M. HNOJCIKOVA, M. NEMEC, BM. ADAMOVA a J. BEDNARIK, 2012. The Computer-Assisted Quantitative Sensory Testing - Normative Data. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. **75**(4), 444-453.
16. BUYKEN, Anette E., Arnold VON ECKARDSTEIN, Helmut SCHULTE, Paul CULLEN a Gerd ASSMANN, 2016. Type 2 diabetes mellitus and risk of coronary heart disease: results of the 10-year follow-up of the PROCAM study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. **14**(2), 230-236. DOI: 10.1097/HJR.0b013e3280142037. ISSN 1741-8267. Dostupné také z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1097/HJR.0b013e3280142037>
17. CANANI, L. H. et al., 2013. Cardiovascular autonomic neuropathy in type 2 diabetes mellitus patients with peripheral artery disease. *Diabetol Metab Syndr*. **5**(1), 54. DOI: 10.1186/1758-5996-5-54. ISSN 1758-5996. Dostupné také z: <https://dmsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1758-5996-5-54>
18. CAO, L., 1997. Practical method for determining the minimum embedding dimension of a scalar time series. *Physica D: Nonlinear Phenomena*. **110**(1-2), 43-50. DOI: 10.1016/S0167-2789(97)00118-8. ISSN 01672789. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167278997001188>
19. CARVER, Terry W., Sadeesh K. SRINATHAN, Christine R. VELLOFF a J. JULIO PÉREZ FONTÁN, 1997. Increased Type I Procollagen mRNA in Airways and Pulmonary Vessels after Vagal Denervation in Rats. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. **17**(6), 691-701. DOI: 10.1165/ajrcmb.17.6.2830. ISSN 1044-1549. Dostupné také z: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/ajrcmb.17.6.2830>
20. CICCACCI, Cinzia, Davide DI FUSCO, Laura CACCIOTTI, et al., 2013. TCF7L2 gene polymorphisms and type 2 diabetes: association with diabetic retinopathy and cardiovascular autonomic neuropathy. *Acta Diabetologica*. **50**(5), 789-799. DOI: 10.1007/s00592-012-0418-x. ISSN 0940-5429. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00592-012-0418-x>
21. CLELAND, S. J., B. M. FISHER, H. M. COLHOUN, N. SATTAR a J. R. PETRIE, 2013. Insulin resistance in type 1 diabetes: what is 'double diabetes' and what are the risks?.

*Diabetologia*. **56**(7), 1462-1470. DOI: 10.1007/s00125-013-2904-2. ISSN 0012-186X.

Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00125-013-2904-2>

22. COBBLE, Michael a Bradley BALE, 2015. Carotid Intima-Media Thickness: Knowledge and Application to Everyday Practice. *Postgraduate Medicine*. **122**(1), 10-18. DOI:

10.3810/pgm.2010.01.2091. ISSN 0032-5481. Dostupné také z:

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3810/pgm.2010.01.2091>

23. COLHOUN, H. M., D. P. FRANCIS, M. B. RUBENS, S. R. UNDERWOOD a J. H.

FULLER, 2001. The Association of Heart-Rate Variability With Cardiovascular Risk Factors and Coronary Artery Calcification: A study in type 1 diabetic patients and the general

population. *Diabetes Care* [online]. **24**(6), 1108-1114. DOI: 10.2337/diacare.24.6.1108. ISSN 0149-5992. Dostupné také z:

<http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/diacare.24.6.1108>

24. CORBIN, Karen D., Kimberly A. DRISCOLL, Richard E. PRATLEY, Steven R. SMITH, David M. MAAHS a Elizabeth J. MAYER-DAVIS, 2018. Obesity in Type 1 Diabetes:

Pathophysiology, Clinical Impact, and Mechanisms. *Endocrine Reviews*. **39**(5), 629-663.

DOI: 10.1210/er.2017-00191. ISSN 0163-769X. Dostupné také z:

<https://academic.oup.com/edrv/article/39/5/629/5060447>

25. CUSPIDI, Cesare, Carla SALA, Marijana TADIC, Elisa GHERBESI, Guido GRASSI a Giuseppe MANCIA, 2016. Nondipping pattern and carotid atherosclerosis. *Journal of Hypertension*. **34**(3), 385-392. DOI: 10.1097/HJH.0000000000000812. ISSN 0263-6352.

26. ČEŠKA, R. et al., 2010. Diabetes Mellitus. *Interna*. Praha: Triton, s. 224–255. ISBN 978-80-7387-423-0.

27. DAFAALLA, Mohamed D., Mohammed N. NIMIR, Mosab I. MOHAMMED, Omer A. ALI a Abbashar HUSSEIN, 2016. Risk factors of diabetic cardiac autonomic neuropathy in patients with type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis. *Open Heart*. **3**(2). DOI:

10.1136/openhrt-2015-000336. ISSN 2053-3624. Dostupné také z:

<http://openheart.bmj.com/lookup/doi/10.1136/openhrt-2015-000336>



28. DE FERRANTI, Sarah D., Ian H. DE BOER, Vivian FONSECA, et al., 2014. Type 1 Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association and American Diabetes Association. *Diabetes Care*. **37**(10), 2843-2863. DOI: 10.2337/dc14-1720. ISSN 0149-5992. Dostupné také z: <http://care.diabetesjournals.org/lookup/doi/10.2337/dc14-1720>
29. DEFRONZO, R. A., 2010. Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. *Diabetologia*. **53**(7), 1270-1287. DOI: 10.1007/s00125-010-1684-1. ISSN 0012-186X. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00125-010-1684-1>
30. DIMITROPOULOS, G., A. A. TAHRANI a M. J. STEVENS, 2014. Cardiac autonomic neuropathy in patients with diabetes mellitus. *World J Diabetes*. **5**(1), 17-39. DOI: 10.4239/wjd.v5.i1.17. ISSN 1948-9358. Dostupné také z: <http://www.wjgnet.com/1948-9358/full/v5/i1/17.htm>
- DVOŘÁK, I. a J. ŠIŠKA, 1991. Teorie deterministického chaosu a některé její aplikace (1. část). *Pokroky matematiky, fyziky a astronomie*. **36**(2), 73-91. ISSN 0032-2423.
31. DING, H., S. CROZIER a S. WILSON, 2008. Optimization of Euclidean distance threshold in the application of recurrence quantification analysis to heart rate variability studies. *Chaos Solitons Fractals*. **38**(5), 1457-1467. DOI: 10.1016/j.chaos.2006.07.059. ISSN 09600779. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096007790800146X>
32. EJSKJAER, N., S. ARIF, W. DODDS, P.J. WATKINS, M.M. ZANONE, D. VERGANI a M. PEAKMAN, 1999. Prevalence of autoantibodies to autonomic nervous tissue structures in Type 1 diabetes mellitus. *Diabetic Medicine* [online]. **16**(7), 544 - 549. DOI: 10.1046/j.1464-5491.1999.00092.x. ISSN 07423071.
33. EL-ATAT, F., A. ANEJA, S. MCFARLANE a J. R. SOWERS, 2003. Obesity and Hypertension. *Endocrinol Metab Clin North Am*. **32**, 823-854.

34. ELIASSON, Björn, 2003. Cigarette smoking and diabetes. *Progress in Cardiovascular Diseases*. **45**(5), 405-413. DOI: 10.1053/pcad.2003.00103. ISSN 00330620. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0033062003000112>
35. EWING, D. J., O. BOLAND, J. M. NEILSON, C. G. CHO a B. F. CLARKE, 1991. Autonomic neuropathy, QT interval lengthening, and unexpected deaths in male diabetic patients. *Diabetologia*. **34**(3), 182-5.
36. FAKHRZADEH, Hossein et al., 2012. Cardiac Autonomic Neuropathy Measured by Heart Rate Variability and Markers of Subclinical Atherosclerosis in Early Type 2 Diabetes. *ISRN Endocrinology*. **2012**, 1-7. DOI: 10.5402/2012/168264. ISSN 2090-4649. Dostupné také z: <https://www.hindawi.com/archive/2012/168264/>
37. FORLEO, C., P. GUIDA, M. IACOVIELLO, M. RESTA, F. MONITILLO, S. SORRENTINO a S. FAVALE, 2013. Head-up tilt testing for diagnosing vasovagal syncope: A meta-analysis. *International Journal of Cardiology*. **168**(1), 27-35. DOI: 10.1016/j.ijcard.2012.09.023. ISSN 01675273. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167527312011291>
38. GARDNER, C. D., S. P. FORTMANN a R. M. KRAUSS, 1996. Association of small low-density lipoprotein particles with the incidence of coronary artery disease in men and women. *JAMA*. **276**(11), 875-81.
39. GAST, Karin B., Nathanja TJEERDEMA, Theo STIJNEN, Johannes W. A. SMIT, Olaf M. DEKKERS a Adrian V. HERNANDEZ, 2012. Insulin Resistance and Risk of Incident Cardiovascular Events in Adults without Diabetes: Meta-Analysis. *PLoS ONE*. **7**(12), e52036. DOI: 10.1371/journal.pone.0052036. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0052036>
40. GIACCO, Ferdinando, Michael BROWNLEE a Ann Marie SCHMIDT, 2010. Oxidative Stress and Diabetic Complications. *Circulation Research*. **107**(9), 1058-1070. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223545. ISSN 0009-7330. Dostupné také z: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.110.223545>

41. GOLAY, A. a J. YBARRA, 2005. Link between obesity and type 2 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* **19**(4), 649-663. DOI: 10.1016/j.beem.2005.07.010. ISSN 1521690X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521690X05000497>
  
42. GOLDBERG, IJ, 2001. Diabetic Dyslipidemia: Causes and Consequences. *The Journal of Clinical Endocrinology* [online]. **86**(3), 965-966. ISSN 0021972X.
  
43. GOLOVCHENKO, I. et al., 2000. Hyperinsulinemia enhances transcriptional activity of nuclear factor-kappaB induced by angiotensin II, hyperglycemia, and advanced glycosylation end products in vascular smooth muscle cells. *Circulation Research* [online]. **87**(9), 746-52. ISSN 15244571.
  
44. GOTTSÄTER, Anders, Åsa Rydén AHLGREN, Soumia TAIMOUR a Göran SUNDKVIST, 2006. Decreased heart rate variability may predict the progression of carotid atherosclerosis in type 2 diabetes. *Clinical Autonomic Research.* **16**(3), 228-234. DOI: 10.1007/s10286-006-0345-4. ISSN 0959-9851. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10286-006-0345-4>
  
45. GRANT, P. J., 2007. Diabetes mellitus as a prothrombotic condition. *Journal of Internal Medicine.* **262**(2), 157-172. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2007.01824.x. ISSN 0954-6820. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2796.2007.01824.x>
  
46. GREENLAND, Philip, Jonathan ABRAMS, Gerard P. AURIGEMMA, et al., 2000. Prevention Conference V: Beyond secondary prevention: identifying the high-risk patient for primary prevention: noninvasive tests of atherosclerotic burden: Writing Group III. *Circulation.* **101**(1), E16-22. DOI: 10.1161/01.CIR.101.1.e16. ISSN 0009-7322. Dostupné také z: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.CIR.101.1.e16>
  
47. GRUNDY, Scott M., Ivor J. BENJAMIN, Gregory L. BURKE, et al., 1999. Diabetes and Cardiovascular Disease. *Circulation.* **100**(10), 1134-1146. DOI: 10.1161/01.CIR.100.10.1134.

ISSN 0009-7322. Dostupné také z:

<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.CIR.100.10.1134>

48. GRUNFELD, B., M. BALZARETI a M. ROMO, 1994. Hyperinsulinemia in normotensive offspring of hypertensive patients. *Hypertension*. **23 (Suppl 1)**, 112-115.

49. GUO, Jingchuan, Rachel G. MILLER, Tina COSTACOU, William P. FOLLANSBEE a Trevor J. ORCHARD, 2018. Left ventricular systolic dysfunction predicts long-term major microvascular complication outcomes in type 1 diabetes. The Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications (EDC) study of childhood onset diabetes. *Journal of Diabetes and its Complications*. **32(3)**, 298-304. DOI: 10.1016/j.jdiacomp.2017.12.004. ISSN 10568727. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1056872717313831>

50. HAFFNER, Steven M., Leena MYKKÄNEN, Andreas FESTA, James P. BURKE a Michael P. STERN, 2000. Insulin-Resistant Prediabetic Subjects Have More Atherogenic Risk Factors Than Insulin-Sensitive Prediabetic Subjects. *Circulation*. **101(9)**, 975-980. DOI: 10.1161/01.CIR.101.9.975. ISSN 0009-7322. Dostupné také z: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.CIR.101.9.975>

51. HAEGELE-LINK, S., D. CLAUS, S. DUCKER, T. VOGT a F. BIRKLEIN, 2008. Evaluation of the Autonomic Nervous System Using the FAN® Device - Range of Normal and Examples of Abnormal. *The Open Neurology Journal*. **2(1)**, 12-19. DOI: 10.2174/1874205X00802010012. ISSN 1874205X. Dostupné také z: <http://benthamopen.com/ABSTRACT/TONEUJ-2-12>

52. HUANG, CJ., CH. KUOK, TBJ. KUO, YW. HSU a PS. TSAI, 2006. Pre-operative measurement of heart rate variability predicts hypotension during general anesthesia. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*. **50(5)**, 542-548. DOI: 10.1111/j.1399-6576.2006.001016.x. ISSN 0001-5172. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-6576.2006.001016.x>

53. IDRIS, I., S. GRAY a R. DONNELLY, 2001. Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetologia*.

44(6), 659-673. DOI: 10.1007/s001250051675. ISSN 0012-186X. Dostupné také z:  
<http://link.springer.com/10.1007/s001250051675>

54. JAVORKA, M., Z. TRUNKVALTEROVA, I. TONHAJZEROVA, Z. LAZAROVA, J. JAVORKOVA a K. JAVORKA, 2008. Recurrences in heart rate dynamics are changed in patients with diabetes mellitus. *Clinical Physiology and Functional Imaging*. **28**(5), 326-331. DOI: 10.1111/j.1475-097X.2008.00813.x. ISSN 14750961. Dostupné také z:  
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1475-097X.2008.00813.x>

55. JUNG, Chan-Hee et al., 2013. Association between Cardiac Autonomic Neuropathy, Diabetic Retinopathy and Carotid Atherosclerosis in Patients with Type 2 Diabetes. *Endocrinology and Metabolism*. **28**(4), 309-19. DOI: 10.3803/EnM.2013.28.4.309. ISSN 2093-596X. Dostupné také z:  
<https://synapse.koreamed.org/DOIX.php?id=10.3803/EnM.2013.28.4.309>

56. JUNG, R.T., 1997. Obesity and nutritional factors in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus. PICKUP, J. C. a G. WILLIAMS, ed. *Textbook of diabetes*. 2. Oxford: Blackwell Science, 19.1-19.23. ISBN 0632038020.

57. KILPATRICK, E. S., A. S. RIGBY a S. L. ATKIN, 2007. Insulin Resistance, the Metabolic Syndrome, and Complication Risk in Type 1 Diabetes: "Double diabetes" in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care*. **30**(3), 707-712. DOI: 10.2337/dc06-1982. ISSN 0149-5992. Dostupné také z:  
<http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/dc06-1982>

58. KIM, Jeong-a, Monica MONTAGNANI, Kwang Kon KOH a Michael J. QUON, 2006. Reciprocal Relationships Between Insulin Resistance and Endothelial Dysfunction. *Circulation*. **113**(15), 1888-1904. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.563213. ISSN 0009-7322. Dostupné také z:  
<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.563213>

59. KNIGHTS, Alexander J., Alister P. W. FUNNELL, Richard C. M. PEARSON, Merlin CROSSLEY a Kim S. BELL-ANDERSON, 2014. Adipokines and insulin action. *Adipocyte*.

3(2), 88-96. DOI: 10.4161/adip.27552. ISSN 2162-3945. Dostupné také z:  
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/adip.27552>

60. KODERA, J. a V. TRAN, 2009. Visual recurrence analysis and its application on the Czech stock market. *Polit. Ekonomie*. **57**(3), 305-322.

61. KOCHIADAKIS, G.E., E.M KANOUPAKIS, N.E IGOUMENIDIS, M.E MARKETOU, M.C SOLOMOU a P.E VARDAS, 1998. Spectral analysis of heart rate variability during tilt-table testing in patients with vasovagal syncope. *International Journal of Cardiology*. **64**(2), 185-194. DOI: 10.1016/S0167-5273(98)00039-4. ISSN 01675273. Dostupné také z:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167527398000394>

62. KOCHIADAKIS, G.E., P.J. LEES, E.M. KANOUPAKIS, N.E. IGOUMENIDIS, E.G. MANIOS a P.E. VARDAS, 1997. Spectral analysis of heart rate variability in the analysis of autonomic nervous system activity during tilt-table testing in patients with unexplained syncope. *Computers in Cardiology 1997*. IEEE, 367-369. DOI: 10.1109/CIC.1997.647909. ISBN 0-7803-4445-6. Dostupné také z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/647909/>

63. KOZAKOVA, Michaela, Carmela MORIZZO, Isabel GONCALVES, Andrea NATALI, Jan NILSSON a Carlo PALOMBO, 2019. Cardiovascular organ damage in type 2 diabetes mellitus: the role of lipids and inflammation. *Cardiovascular Diabetology* [online]. **18**(1). DOI: 10.1186/s12933-019-0865-6. ISSN 1475-2840. Dostupné také z:  
<https://cardiab.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12933-019-0865-6>

64. KUWAHARA, Keisuke, Toru HONDA, Tohru NAKAGAWA, Shuichiro YAMAMOTO, Takeshi HAYASHI a Tetsuya MIZOUE, 2017. Body mass index trajectory patterns and changes in visceral fat and glucose metabolism before the onset of type 2 diabetes. *Scientific Reports*. **7**(1), 43521. DOI: 10.1038/srep43521. ISSN 2045-2322. Dostupné také z:  
<http://www.nature.com/articles/srep43521>

65. KUWAJIMA, Iwao, Yasuko SUZUKI, Tatsuo SHIMOSAWA, Akiko KANEMARU, Satoshi HOSHINO a Kizuku KURAMOTO, 1992. Diminished nocturnal decline in blood pressure in elderly hypertensive patients with left ventricular hypertrophy. *American Heart*

*Journal*. **123**(5), 1307-1311. DOI: 10.1016/0002-8703(92)91038-3. ISSN 00028703.

Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0002870392910383>

66. LAAKSO, M., 1999. Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetes*. **48**(5), 937–942.

67. LAAKSO, Markku a Johanna KUUSISTO, 2014. Insulin resistance and hyperglycaemia in cardiovascular disease development. *Nature Reviews Endocrinology*. **10**(5), 293-302. DOI: 10.1038/nrendo.2014.29. ISSN 1759-5029. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/nrendo.2014.29>

68. LACIGOVÁ, S., Z. RUŠAVÝ, A. JIRKOVSKÁ a J. ŠKRHA, 2016. DOPORUČENÝ POSTUP DIAGNOSTIKY A LÉČBY DIABETICKÉ NEUROPATIE. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa* [online]. **19**(2), 57-63 [cit. 2019-07-03]. Dostupné z: [http://www.diab.cz/dokumenty/standardy\\_neuropatie.pdf](http://www.diab.cz/dokumenty/standardy_neuropatie.pdf)

69. LAFFERTY, A. R., G. A. WERTHER a C. F. CLARKE, 2000. Ambulatory blood pressure, microalbuminuria, and autonomic nephropathy in adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. **23**, 533-538.

70. LAGI, A., C. TAMBURINI, M. CIPRIANI a L. FATTORINI, 1997. Vagal control of heart rate variability in vasovagal syncope: studies based on 24-h electrocardiogram recordings. *Clin Auton Res*. **7**(3), 127-30.

71. LEBOVITZ, H., 2001. Insulin resistance: definition and consequences. *Exp ClinEndocrinol Diabetes*. **109**(Suppl 2), S135-S148. DOI: 10.1055/s-2001-18576. ISSN 0947-7349. Dostupné také z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2001-18576>

72. LEE, ET, H KEEN, PH BENNETT, JH FULLER a M LU, 2001. Follow-up of the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes: general description and morbidity. *Diabetologia* [online]. **44 Suppl 2**, S3-13. ISSN 0012186X.

73. LIATIS, S., K. ALEXIADOU, A. TSIAKOU, K. MAKRILAKIS, N. KATSIAMBROS a N. TENTOLOURIS, 2011. Cardiac Autonomic Function Correlates with Arterial Stiffness in the Early Stage of Type 1 Diabetes. *Experimental Diabetes Research*. **2011**, 1-7. DOI: 10.1155/2011/957901. ISSN 1687-5214. Dostupné také z: <http://www.hindawi.com/journals/jdr/2011/957901/>
74. LOPES-VIRELLA, Maria F., Michael Brent MCHENRY, Stuart LIPSITZ, et al., 2007. Immune complexes containing modified lipoproteins are related to the progression of internal carotid intima-media thickness in patients with type 1 diabetes. *Atherosclerosis* [online]. **190**(2), 359-369. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2006.02.007. ISSN 00219150. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002191500600061X>
75. LORENZ, Matthias W., Stefan VON KEGLER, Helmuth STEINMETZ, Hugh S. MARKUS a Matthias SITZER, 2006. Carotid Intima-Media Thickening Indicates a Higher Vascular Risk Across a Wide Age Range. *Stroke*. **37**(1), 87-92. DOI: 10.1161/01.STR.0000196964.24024.ea. ISSN 0039-2499. Dostupné také z: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.STR.0000196964.24024.ea>
76. LURBE, Empar, Josep REDON, Ajit KESANI, Jose Maria PASCUAL, Jose TACONS, Vicente ALVAREZ a Daniel BATLLE, 2002. Increase in Nocturnal Blood Pressure and Progression to Microalbuminuria in Type 1 Diabetes. *New England Journal of Medicine*. **347**(11), 797-805. DOI: 10.1056/NEJMoa013410. ISSN 0028-4793. Dostupné také z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa013410>
77. MADONNA, Rosalinda a Raffaele DE CATERINA, 2012. Aterogénesis y diabetes: resistencia a la insulina e hiperinsulinemia. *Revista Española de Cardiología*. **65**(4), 309-313. DOI: 10.1016/j.recesp.2011.11.010. ISSN 03008932. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300893212000061>
78. MADONNA, R., A. PANDOLFI, M. MASSARO, A. CONSOLI a R. DE CATERINA, 2004. Insulin enhances vascular cell adhesion molecule-1 expression in human cultured endothelial cells through a pro-atherogenic pathway mediated by p38 mitogen-activated



protein-kinase. *Diabetologia*. **47**(3), 532-536. DOI: 10.1007/s00125-004-1330-x. ISSN 0012-186X. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00125-004-1330-x>

79. MALÁ, Š., L. HOSKOVCOVÁ a J. ŠŤOVÍČEK, 2017. Možnosti diagnostiky a terapie diabetické autonomní neuropatie. *Acta Medicinæ*. **2**(6), 80-83.

80. MALÁ, Š., J. ŠŤOVÍČEK a M. KVAPIL, 2015. Kardiovaskulární autonomní neuropatie. *Postgraduální medicína*. **17**(1), 86-88.

81. MALIK, M., 1996. Heart rate variability: Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Circulation* [online]. **93**(5), 1043 - 1065. ISSN 00097322.

82. MANCIA, Giuseppe, Alberto ZANCHETTI, Enrico AGEBITI-ROSEI, et al., 1997. Ambulatory Blood Pressure Is Superior to Clinic Blood Pressure in Predicting Treatment-Induced Regression of Left Ventricular Hypertrophy. *Circulation*. **95**(6), 1464-1470. DOI: 10.1161/01.CIR.95.6.1464. ISSN 0009-7322. Dostupné také z: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.CIR.95.6.1464>

83. MANGONI, AA, C GIANNATTASIO, G MANCIA, L MIRCOLI a AU FERRARI, 1996. Heart rate-dependence of arterial distensibility in vivo. *Journal of Hypertension* [online]. **14**(7), 897 - 901. DOI: 10.1097/00004872-199607000-00013. ISSN 02636352.

84. MANGONI, AA, L MIRCOLI, C GIANNATTASIO, G MANCIA a AU FERRARI, 1997. Effect of sympathectomy on mechanical properties of common carotid and femoral arteries. *Hypertension: 1979*) [online]. **30**(5), 1085-8. ISSN 0194911X.

85. MARWAN, N., N. WESSEL, U. MEYERFELDT, A. SCHIRDEWAN a J. KURTHS, 2002. Recurrence-plot-based measures of complexity and their application to heart-rate-variability data. *Physical Review E*. **66**(2). DOI: 10.1103/PhysRevE.66.026702. ISSN 1063-651X. Dostupné také z: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.66.026702>

86. MARWAN, N., M. CARMENROMANO, M. THIEL a J. KURTHS, 2007. Recurrence plots for the analysis of complex systems. *Physics Reports*. **438**(5-6), 237-329. DOI:

10.1016/j.physrep.2006.11.001. ISSN 03701573. Dostupné také z:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0370157306004066>

87. MASER, RE. et al., 1990. Diabetic autonomic neuropathy and cardiovascular risk. Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study III. *Archives of internal medicine*. **150**, 1218-1222.

88. MASER, RE. a MJ. LENHARD, 2007. An overview of the effect of weight loss on cardiovascular autonomic function. *Current diabetes review*. **3**(3), 204-11.

89. MASER, R. E., B. D. MITCHELL, A. I. VINIK a R. FREEMAN, 2003. The Association Between Cardiovascular Autonomic Neuropathy and Mortality in Individuals With Diabetes: A meta-analysis. *Diabetes Care*. **26**(6), 1895-1901. DOI: 10.2337/diacare.26.6.1895. ISSN 0149-5992. Dostupné také z:  
<http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/diacare.26.6.1895>

90. MATHEBULA, S. D., 2015. Polyol pathway: A possible mechanism of diabetes complications in the eye. *African Vision and Eye Health* [online]. **74**(1), 5. DOI: 10.4102/aveh.v74i1.13. ISSN 24101516.

91. MAZZONE, Theodore, Alan CHAIT a Jorge PLUTZKY, 2008. Cardiovascular disease risk in type 2 diabetes mellitus: insights from mechanistic studies. *The Lancet*. **371**(9626), 1800-1809. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)60768-0. ISSN 01406736. Dostupné také z:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673608607680>

92. MEYER, C., F. MILAT, B. P. MCGRATH, J. CAMERON, D. KOTSOPOULOS a H. J. TEEDE, 2004. Vascular dysfunction and autonomic neuropathy in Type 2 diabetes. *Diabetic Medicine*. **21**(7), 746-751. DOI: 10.1111/j.1464-5491.2004.01241.x. ISSN 07423071. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1464-5491.2004.01241.x>

93. MIRCOLI, L, AA MANGONI, C GIANNATTASIO, G MANCIA a AU FERRARI, 1999. Heart rate-dependent stiffening of large arteries in intact and sympathectomized rats. *Hypertension* [online]. **34**(4), 598-602. ISSN 0194911X.

94. MONTAGNANI, Monica, Inga GOLOVCHENKO, Injune KIM, et al., 2002. Inhibition of Phosphatidylinositol 3-Kinase Enhances Mitogenic Actions of Insulin in Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*. **277**(3), 1794-1799. DOI: 10.1074/jbc.M103728200. ISSN 0021-9258. Dostupné také z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M103728200>
95. MONTAGNANI, Monica, Hui CHEN, Valarie A. BARR a Michael J. QUON, 2001. Insulin-stimulated Activation of eNOS Is Independent of Ca<sup>2+</sup> but Requires Phosphorylation by Akt at Ser 1179. *Journal of Biological Chemistry*. **276**(32), 30392-30398. DOI: 10.1074/jbc.M103702200. ISSN 0021-9258. Dostupné také z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M103702200>
96. MURATA, Katsuyuki, Philip LANDRIGAN a Shunichi ARAKI, 1992. Effects of age, heart rate, gender, tobacco and alcohol ingestion on R-R interval variability in human ECG. *Journal of the Autonomic Nervous System*. **37**, 199-206.
97. NATARAJAN, R., RG. GERRITY, JL. GU, L. LANTING, L. THOMAS a JL. NADLER, 2002. Role of 12-lipoxygenase and oxidant stress in hyperglycaemia-induced acceleration of atherosclerosis in a diabetic pig model. *Diabetologia*. **45**(1), 125-33. DOI: 10.1007/s001250200014.
98. NATHAN, D. M., S. GENUTH a J. et al. LACHIN, 1993. The Effect of Intensive Treatment of Diabetes on the Development and Progression of Long-Term Complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *New England Journal of Medicine*. **329**(14), 977-986. DOI: 10.1056/NEJM199309303291401. ISSN 0028-4793. Dostupné také z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199309303291401>
99. NICOLLS, Mark R., Kathryn HASKINS a Sonia C. FLORES, 2007. Oxidant Stress, Immune Dysregulation, and Vascular Function in Type I Diabetes. *Antioxid Redox Signal*. **9**(7), 879-889. DOI: 10.1089/ars.2007.1631. ISSN 1523-0864. Dostupné také z: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2007.1631>

100. NISKANEN, JP., MP. TARVAINEN, PO. RANTA-AHO a PA. KARJALAINEN, 2004. Software for advanced HRV analysis. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*. **76**(1), 73-81. DOI: 10.1016/j.cmpb.2004.03.004. ISSN 01692607. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169260704000719>
101. OAKLEY, Ingrid a Lyne EMOND, 2011. Diabetic Cardiac Autonomic Neuropathy and Anesthetic Management: Review of the Literature. *AANA Journal* [online]. **79**(6), 473-479. ISSN 00946354.
102. PAMBIANCO, G., T. COSTACOU a T. J. ORCHARD, 2007. The Prediction of Major Outcomes of Type 1 Diabetes: a 12-Year Prospective Evaluation of Three Separate Definitions of the Metabolic Syndrome and Their Components and Estimated Glucose Disposal Rate. *Diabetes Care*. **30**(5), 1248-1254. DOI: 10.2337/dc06-2053. ISSN 0149-5992. Dostupné také z: <http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/dc06-2053>
103. PANENI, Francesco, Joshua A. BECKMAN, Mark A. CREAGER a Francesco COSENTINO, 2013. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy. *European Heart Journal*. **34**(31), 2436-2443. DOI: 10.1093/eurheartj/eh149. ISSN 1522-9645. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/eurheartj/article-lookup/doi/10.1093/eurheartj/eh149>
104. PELIKÁNOVÁ, T. et al., 2011. Klasifikace a patogeneze diabetu. *Praktická diabetologie*. 5. aktualizované vydání. Praha: Maxdorf, s. 60–101. Jessenius. ISBN 978-80-7345-244-5.
105. PELIKÁNOVÁ, T. a J. VÁLEK, 2011. Diabetická makroangiopatie. PELIKÁNOVÁ, T. et al. *Praktická diabetologie*. 5. aktualizované vydání. Praha: Maxdorf, s. 450-453. ISBN 978-80-7345-244-5.
106. PERK, J., G. DE BACKER et al., 2012. European Guidelines on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (Version 2012): The Fifth Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *International Journal*

*of Behavioral Medicine*. **19**(4), 403-488. DOI: 10.1007/s12529-012-9242-5. ISSN 1070-5503.  
Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s12529-012-9242-5>

107. PETKOVIĆ, D. a Ž. ČOJBAŠIĆ, 2012. Adaptive neuro-fuzzy estimation of autonomic nervous system parameters effect on heart rate variability. *Neural Computing and Applications*. **21**(8), 2065-2070. DOI: 10.1007/s00521-011-0629-z. ISSN 0941-0643.  
Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00521-011-0629-z>

108. PICCIRILLO, G., C. NASO, A. MOISÈ et al., 2004. Heart rate and blood pressure variability in subjects with vasovagal syncope. *Clinical Science*. **107**(1), 55-61. DOI: 10.1042/CS20030327. ISSN 0143-5221. Dostupné také z: <http://www.clinsci.org/cgi/doi/10.1042/CS20030327>

109. PIETRUCHA, A., Z. WOJEWÓDKA-ZAK, M. WNUK et al., 2009. The effects of gender and test protocol on the results of head-up tilt test in patients with vasovagal syncope. *Kardiologia polska*. **67**(8A), 1029-34.

110. PIZZI, Carmine, Lamberto MANZOLI, Stefano MANCINI, Gigliola BEDETTI, Fiorella FONTANA a Grazia Maria COSTA, 2010. Autonomic nervous system, inflammation and preclinical carotid atherosclerosis in depressed subjects with coronary risk factors. *Atherosclerosis*. **212**(1), 292-298. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.04.038. ISSN 00219150. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021915010003291>

111. POLITI, Cristina, Cinzia CICCACCI, Cinzia D'AMATO, Giuseppe NOVELLI, Paola BORGIANI a Vincenza SPALLONE, 2016. Recent advances in exploring the genetic susceptibility to diabetic neuropathy. *Diabetes Research and Clinical Practice*. **120**, 198-208. DOI: 10.1016/j.diabres.2016.08.006. ISSN 01688227. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168822716304296>

112. POWERS, Alvin C., [2015]. Diabetes Mellitus: Complications. KASPER, D. et al., ed. *Harrison's principles of internal medicine*. 19th edition. New York: McGraw Hill Education, s. 2422-2430. ISBN 978-0071802154.

113. PRINCE, C. T., A. M. SECREST, R. H. MACKEY, V. C. ARENA, L. A. KINGSLEY a T. J. ORCHARD, 2010. Cardiovascular Autonomic Neuropathy, HDL Cholesterol, and Smoking Correlate With Arterial Stiffness Markers Determined 18 Years Later in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*. **33**(3), 652-657. DOI: 10.2337/dc09-1936. ISSN 0149-5992.

Dostupné také z: <http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/dc09-1936>

114. PURNELL, Jonathan Q., Bernard ZINMAN a John D. BRUNZELL, 2013. The Effect of Excess Weight Gain With Intensive Diabetes Mellitus Treatment on Cardiovascular Disease Risk Factors and Atherosclerosis in Type 1 Diabetes Mellitus. *Circulation*. **127**(2), 180-187.

DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.077487. ISSN 0009-7322. Dostupné také z: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.077487>

115. RABINOWE, S. L., F. M. BROWN, M. WATTS a A. M. SMITH, 1990. Complement-Fixing Antibodies to Sympathetic and Parasympathetic Tissues in IDDM: Autonomic Brake Index and Heart-Rate Variation. *Diabetes Care*. **13**(10), 1084-1088. DOI:

10.2337/diacare.13.10.1084. ISSN 0149-5992. Dostupné také z: <http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/diacare.13.10.1084>

116. RAFIEIAN-KOPAEI, Mahmoud, Mahbubeh SETORKI, Monir DOUDI, Azar BARADARAN a Hamid NASRI, 2014. Atherosclerosis: Process, Indicators, Risk Factors and New Hopes. *International Journal of Preventive Medicine* [online]. **5**(8), 927-946. ISSN 20087802.

117. RIDRAY, S., 1995. Hyperinsulinemia and smooth muscle cell proliferation. *Int J Obes Relat Metab Disord*. **19 Suppl 1**, 39-51.

118. RODRIGUES, Ticiana C., James EHRLICH, Cortney M. HUNTER, Gregory L. KINNEY, Marian REWERS a Janet K. SNELL-BERGEON, 2010. Reduced Heart Rate Variability Predicts Progression of Coronary Artery Calcification in Adults with Type 1 Diabetes and Controls Without Diabetes. *Diabetes Technology & Therapeutics*. **12**(12), 963-969. DOI: 10.1089/dia.2010.0070. ISSN 1520-9156. Dostupné také z:

<http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/dia.2010.0070>

119. RUSSELL, James C. a Spencer D. PROCTOR, 2006. Small animal models of cardiovascular disease: tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis. *Cardiovascular Pathology*. **15**(6), 318-330. DOI: 10.1016/j.carpath.2006.09.001. ISSN 10548807. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1054880706001463>
120. SAMPANIS, C. a C. ZAMBOULIS, 2008. Arterial hypertension in diabetes mellitus: From theory to clinical practice. *Hippokratia* [online]. **12**(2), 74-80. ISSN 11084189.
121. SENYIGIT, A., H. UZUN, I. GULTEPE a D. KONUKOGLU, 2019. The relationship between carotid intima-media thickness and serum secreted frizzled-related protein-4 and dipeptidyl peptidase-4 in diabetic patients with cardiovascular diseases. *Bratislava Medical Journal* [online]. **120**(03), 188-194. DOI: 10.4149/BLL\_2019\_032. ISSN 1336-0345. Dostupné také z: [http://www.elis.sk/index.php?page=shop.product\\_details&flypage=flypage.tpl&product\\_id=6069&category\\_id=146&option=com\\_virtuemart](http://www.elis.sk/index.php?page=shop.product_details&flypage=flypage.tpl&product_id=6069&category_id=146&option=com_virtuemart)
122. SERRANO, Rios M., 1998. Relationship between obesity and the increased risk of major complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *European Journal Of Clinical Investigation* [online]. **28 Suppl 2**, 14-7, discussion 17-8. ISSN 00142972.
123. SHARMA, V., 2009. Deterministic Chaos and Fractal Complexity in the Dynamics of Cardiovascular Behavior: Perspectives on a New Frontier. *The Open Cardiovascular Medicine Journal*. **3**(1), 110-123. DOI: 10.2174/1874192400903010110. ISSN 18741924. Dostupné také z: <http://benthamopen.com/ABSTRACT/TOCMJ-3-110>
124. SHAW, J. E. a P. Z. ZIMMET, 1999. The epidemiology of diabetic neuropathy. *Diabetes Reviews*. **7**(4), 245-252.
125. SHIN, Hwa Kyoung, Yong Ki KIM, Ki Young KIM, Jeong Hyun LEE a Ki Whan HONG, 2004. Remnant Lipoprotein Particles Induce Apoptosis in Endothelial Cells by NAD(P)H Oxidase-Mediated Production of Superoxide and Cytokines via Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1 Activation. *Circulation*. **109**(8), 1022-1028.

DOI: 10.1161/01.CIR.0000117403.64398.53. ISSN 0009-7322. Dostupné také z:  
<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.CIR.0000117403.64398.53>

126. SCHLENKER, J., T. NEDELKA, L. RIEDLBAUCHOVA, V. SOCHA, K. HANA a P. KUTILEK, 2014. Recurrence Quantification Analysis: A Promising Method for Data Evaluation in Medicine. *European Journal for Biomedical Informatics*. **10**(1), 35-40. DOI: 10.24105/ejbi.2014.10.1.7. ISSN 18015603. Dostupné také z: <https://www.ejbi.org/scholarly-articles/recurrence-quantification-analysis-a-promising-method-for-data-evaluation-in-medicine.pdf>

127. SCHLENKER, J., V. SOCHA, L. RIEDLBAUCHOVÁ, T. NEDĚLKA, A. SCHLENKER, V. POTOČKOVÁ, Š. MALÁ a P. KUTÍLEK, 2016. Recurrence plot of heart rate variability signal in patients with vasovagal syncope. *Biomedical Signal Processing and Control*. **25**, 1-11. DOI: 10.1016/j.bspc.2015.10.007. ISSN 17468094. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1746809415001731>

128. SCHWARTZ, C. J., A. J. VALENTE, E. A. SPRAGUE, J. L. KELLEY, A. J. CAYATTE a M. M. ROZEK, 1992. Pathogenesis of the Atherosclerotic Lesion: Implications for diabetes mellitus. *Diabetes Care*. **15**(9), 1156-1167. DOI: 10.2337/diacare.15.9.1156. ISSN 0149-5992. Dostupné také z: <http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/diacare.15.9.1156>

129. SCHINKEL, S., O. DIMIGEN a N. MARWAN, 2008. Selection of recurrence threshold for signal detection. *The European Physical Journal Special Topics*. **164**(1), 45-53. DOI: 10.1140/epjst/e2008-00833-5. ISSN 1951-6355. Dostupné také z: <http://www.springerlink.com/index/10.1140/epjst/e2008-00833-5>

130. SCHINKEL, S., N. MARWAN, O. DIMIGEN a J. KURTHS, 2009. Confidence bounds of recurrence-based complexity measures. *Physics Letters A*. **373**(26), 2245-2250. DOI: 10.1016/j.physleta.2009.04.045. ISSN 03759601. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0375960109005179>



131. SILIPO, R., G. DECO, R. VERGASSOLA a H. BARTSCH, 1998. Dynamics extraction in multivariate biomedical time series. *Biological Cybernetics*. **79**(1), 15-27. DOI: 10.1007/s004220050454. ISSN 0340-1200. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s004220050454>
132. SIVENIUS, Katariina, Leo NISKANEN, Markku LAAKSO a Matti UUSITUPA, 2003. A Deletion in the  $\alpha$  2B -Adrenergic Receptor Gene and Autonomic Nervous Function in Central Obesity. *Obesity Research*. **11**(8), 962-970. DOI: 10.1038/oby.2003.133. ISSN 10717323. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1038/oby.2003.133>
133. SNELL-BERGEON, Janet K. a Kristen NADEAU, 2012. Cardiovascular Disease Risk in Young People with Type 1 Diabetes. *Journal of Cardiovascular Translational Research*. **5**(4), 446-462. DOI: 10.1007/s12265-012-9363-x. ISSN 1937-5387. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s12265-012-9363-x>
134. SNIDERMAN, Allan D., Thea SCANTLEBURY a Katherine CIANFLONE, 2001. Hypertriglyceridemic HyperapoB: The Unappreciated Atherogenic Dyslipoproteinemia in Type 2 Diabetes Mellitus. *Annals of Internal Medicine*. **135**(6), 447–59. DOI: 10.7326/0003-4819-135-6-200109180-00014. ISSN 0003-4819. Dostupné také z: <http://annals.org/article.aspx?doi=10.7326/0003-4819-135-6-200109180-00014>
135. SOWERS, J., M. EPSTEIN a E. FROHLICH, 2001. Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease - An update. *HYPERTENSION* [online]. **37**(4), 1053-1059. ISSN 0194911X.
136. SPALLONE, V., L. BERNARDI, L. RICORDI, et al., 1993. Relationship Between the Circadian Rhythms of Blood Pressure and Sympathovagal Balance in Diabetic Autonomic Neuropathy. *Diabetes*. **42**(12), 1745-1752. DOI: 10.2337/diab.42.12.1745. ISSN 0012-1797. Dostupné také z: <http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/diab.42.12.1745>
137. SPALLONE, Vincenza, Dan ZIEGLER, Roy FREEMAN, et al., 2011. Cardiovascular autonomic neuropathy in diabetes: clinical impact, assessment, diagnosis, and management.

*Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. **27**(7), 639-653. DOI: 10.1002/dmrr.1239. ISSN 15207552. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/dmrr.1239>

138. SPALLONE, V., MR. MAIELLO, E. CICCONE, A. PANNONE, A. BARINI, S. GAMBARDELLA a G. MENZINGER, 2001. Factors determining the 24-h blood pressure profile in normotensive patients with type 1 and type 2 diabetes. *Journal of Human Hypertension*. **15**(4), 239-246. DOI: 10.1038/sj.jhh.1001170. ISSN 0950-9240. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/1001170>

139. STAMLER, J., O. VACCARO, J. D. NEATON a D. WENTWORTH, 1993. Diabetes, Other Risk Factors, and 12-Yr Cardiovascular Mortality for Men Screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care*. **16**(2), 434-444. DOI: 10.2337/diacare.16.2.434. ISSN 0149-5992. Dostupné také z: <http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/diacare.16.2.434>

140. STEFANO, George B., Sean CHALLENGER a Richard M. KREAM, 2016. Hyperglycemia-associated alterations in cellular signaling and dysregulated mitochondrial bioenergetics in human metabolic disorders. *European Journal of Nutrition*. **55**(8), 2339-2345. DOI: 10.1007/s00394-016-1212-2. ISSN 1436-6207. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00394-016-1212-2>

141. STOUT, R. W., 1990. Insulin and Atheroma: 20-Yr Perspective. *Diabetes Care*. **13**(6), 631-654. DOI: 10.2337/diacare.13.6.631. ISSN 0149-5992. Dostupné také z: <http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/diacare.13.6.631>

142. SUKLA, P., S. SHRIVASTAVA, P. SHRIVASTAVA a N. RAO, 2016. Assessment of the cardiac autonomic neuropathy among the known diabetics and age-matched controls using noninvasive cardiovascular reflex tests in a South-Indian population: A case-control study. *Avicenna Journal of Medicine*. **6**(3), 81-5. DOI: 10.4103/2231-0770.184067. ISSN 2231-0770. Dostupné také z: <http://www.avicennajmed.com/text.asp?2016/6/3/81/184067>

143. SUN, Yi-Peng, Yuan-Yuan CAI, Hong-Miao LI, Sen-Miao DENG, Rui-Xue LENG a Hai-Feng PAN, 2015. Increased carotid intima-media thickness (CIMT) levels in patients

with type 1 diabetes mellitus (T1DM): A meta-analysis. *Journal of Diabetes and its Complications* [online]. **29**(5), 724-730. DOI: 10.1016/j.jdiacomp.2015.03.018. ISSN 10568727. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1056872715001142>

144. ŠKRHA, J., 2011. Patogeneze vaskulárních komplikací diabetu. PELIKÁNOVÁ, T. et al. *Praktická diabetologie*. 5. aktualizované vydání. Praha: Maxdorf, s. 373-554. ISBN 978-80-7345-244-5.

145. TAN, Ee Phie, Maria T. VILLAR a Lezi et al. E, 2014. Altering O -Linked  $\beta$ - N - Acetylglucosamine Cycling Disrupts Mitochondrial Function. *Journal of Biological Chemistry*. **289**(21), 14719-14730. DOI: 10.1074/jbc.M113.525790. ISSN 0021-9258. Dostupné také z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M113.525790>

146. THEILADE, S., M. LAJER, F. PERSSON, C. JOERGENSEN a P. ROSSING, 2013. Arterial Stiffness Is Associated With Cardiovascular, Renal, Retinal, and Autonomic Disease in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*. **36**(3), 715-721. DOI: 10.2337/dc12-0850. ISSN 0149-5992. Dostupné také z: <http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/dc12-0850>

147. TING, Harold J., James P. STICE, Ulrich Y. SCHAFF, David Y. HUI, John C. RUTLEDGE, Anne A. KNOWLTON, Anthony G. PASSERINI a Scott I. SIMON, 2007. Triglyceride-Rich Lipoproteins Prime Aortic Endothelium for an Enhanced Inflammatory Response to Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ . *Circulation Research*. **100**(3), 381-390. DOI: 10.1161/01.RES.0000258023.76515.a3. ISSN 0009-7330. Dostupné také z: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.RES.0000258023.76515.a3>

148. TRAUTH, M. a E. SILLMANN, 2013. *MATLAB® and design recipes for earth sciences: how to collect, process and present geoscientific information*. New York: Springer. ISBN 978-3-642-32543-4.

149. ULLERYD, Marcus A., Ulrica PRAHL, Johannes BÖRSBO, Caroline SCHMIDT, Staffan NILSSON, Göran BERGSTRÖM, Maria E. JOHANSSON a Christian SCHULZ, 2017. The association between autonomic dysfunction, inflammation and atherosclerosis in men under investigation for carotid plaques. *PLOS ONE*. **12**(4). DOI:

10.1371/journal.pone.0174974. ISSN 1932-6203. Dostupné také z:  
<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0174974>

150. VERDECCHIA, P, G SCHILLACI, M GUERRIERI, C GATTESCHI, G BENEMIO, F BOLDRINI a C PORCELLATI, 1990. Circadian blood pressure changes and left ventricular hypertrophy in essential hypertension. *Circulation*. **81**(2), 528-536. DOI: 10.1161/01.CIR.81.2.528. ISSN 0009-7322. Dostupné také z:  
<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.CIR.81.2.528>

151. VINIK, Aaron I. a Dan ZIEGLER, 2007. Diabetic Cardiovascular Autonomic Neuropathy. *Circulation*. **115**(3), 387-397. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.634949. ISSN 0009-7322. Dostupné také z:  
<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.634949>

152. VINIK, A. I., S. B. LEICHTER, G. L. PITTENGER, K. B. STANSBERRY, M. T. HOLLAND, A. C. POWERS a S. SUWANWALAIKORN, 1995. Phospholipid and Glutamic Acid Decarboxylase Autoantibodies in Diabetic Neuropathy. *Diabetes Care*. **18**(9), 1225-1232. DOI: 10.2337/diacare.18.9.1225. ISSN 0149-5992. Dostupné také z:  
<http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/diacare.18.9.1225>

153. VINIK, A. I., R. E. MASER, B. D. MITCHELL a R. FREEMAN, 2003. Diabetic Autonomic Neuropathy. *Diabetes Care*. **26**(5), 1553-1579. DOI: 10.2337/diacare.26.5.1553. ISSN 0149-5992. Dostupné také z:  
<http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/diacare.26.5.1553>

154. VLČKOVÁ, E., J. BEDNAŘÍK, Š. BURŠOVÁ, K. ŠAJGALÍKOVÁ a L. MLČÁKOVÁ, 2010. Spektrální analýza variability srdeční frekvence – normativní data. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie* [online]. (6), 663-672 [cit. 2019-07-02]. Dostupné z: <https://www.csnn.eu/casopisy/ceska-slovenska-neurologie/2010-6/spektralni-analyza-variability-srdecni-frekvence-normativni-data-33861>

155. VOJTKOVÁ, Jarmila, Peter ĎURDÍK, Miriam ČILJAKOVÁ, Zuzana MICHNOVÁ, Tomáš TURČAN a Eva BABUŠÍKOVÁ, 2013. The association between glutathione S-

transferase T1 and M1 gene polymorphisms and cardiovascular autonomic neuropathy in Slovak adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and its Complications*. **27**(1), 44-48. DOI: 10.1016/j.jdiacomp.2012.07.002. ISSN 10568727. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1056872712002231>

156. WANG, Hong, Man YU, Mahendar OCHANI, et al., 2003. Nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*. **421**(6921), 384-388. DOI: 10.1038/nature01339. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/nature01339>

157. WAYS, D. K. a M. J. SHEETZ, 2000. The role of protein kinase C in the development of the complications of diabetes. *Vitam. Horm.* **60**, 149-193.

158. YAGIHASHI, Soroku, Shin-Ichiro YAMAGISHI a Ryuichi WADA, 2007. Pathology and pathogenetic mechanisms of diabetic neuropathy: Correlation with clinical signs and symptoms. *Diabetes Research and Clinical Practice* [online]. **77**(3), S184-S189. DOI: 10.1016/j.diabres.2007.01.054. ISSN 01688227. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168822707001854>

159. YARIBEYGI, Habib, Stephen L. ATKIN a Amirhossein SAHEBKAR, 2019. A review of the molecular mechanisms of hyperglycemia-induced free radical generation leading to oxidative stress. *Journal of Cellular Physiology*. **234**(2), 1300-1312. DOI: 10.1002/jcp.27164. ISSN 00219541. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.27164>

160. YASUDA, H., M. TERADA, K. MAEDA, S. KOGAWA, M. SANADA, M. HANEDA, A. KASHIWAGI a R. KIKKAWA, 2003. Diabetic neuropathy and nerve regeneration. *Progress In Neurobiology* [online]. **69**(4), 229-85. ISSN 03010082.

161. YOUNUS, H. a S. ANWAR, 2016. Prevention of non-enzymatic glycosylation (glycation): Implication in the treatment of diabetic complication. *International Journal Of Health Sciences* [online]. **10**(2), 261-77. ISSN 16583639.

162. ZIEGLER, D., 2001. Diagnosis and treatment of diabetic autonomic neuropathy. *Current Diabetes Reports* [online]. **1**(3), 216-27. ISSN 15344827.
163. ZIEGLER, D., K. DANNEHL, H. MÜHLEN, M. SPÜLER a FA. GRIES, 1992. Prevalence of cardiovascular autonomic dysfunction assessed by spectral analysis, vector analysis, and standard tests of heart rate variation and blood pressure responses at various stages of diabetic neuropathy. *Diabet Med.* **9**(9), 806-14.
164. ZUNKER, P. et al., 1996. Hyperinsulinism and Cerebral Microangiopathy. *Stroke A Journal of Cerebral Circulation* [online]. **27**(2), 219-220. ISSN 00392499.
165. ZVÁROVÁ, J., 2011. *Základy statistiky pro biomedicínské obory*. 2., dopl. vyd. Praha: Karolinum. Biomedicínská statistika. ISBN 978-80-246-1931-6.
166. ZVOLSKÝ, M., 2015. Činnost oboru diabetologie, péče o diabetiky v roce 2013. *Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR* [online]. Praha: ÚZIS ČR [cit. 2019-07-04]. Dostupné z: <http://www.uzis.cz/rychle-informace/cinnost-oboru-diabetologie-pece-diabetiky-roce-2013>
167. Data o diabetu v ČR, 2014. *Diabetická asociace České republiky* [online]. Praha: Diabetická asociace ČR [cit. 2019-07-04]. Dostupné z: <http://diabetickaasociace.cz/co-je-diabetes/data-o-diabetu-v-cr/>

## 12. Publikační činnost

### A) Publikace, které jsou podkladem dizertace:

#### a) s IF:

1. MALÁ, Šárka, Veronika POTOČKOVÁ, Lucie HOSKOVCOVÁ, et al., 2017. Cardiac autonomic neuropathy may play a role in pathogenesis of atherosclerosis in type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 134, 139-144. ISSN 01688227. Dostupné z: doi:10.1016/j.diabres.2017.10.002  
**IF 3,239**
2. SCHLENKER, Jakub, Vladimír SOCHA, Lucie RIEDLBAUCHOVÁ, Tomáš NEDĚLKA, Anna SCHLENKER, Veronika POTOČKOVÁ, Šárka MALÁ a Patrik KUTÍLEK, 2016. Recurrence plot of heart rate variability signal in patients with vasovagal syncope. *Biomedical Signal Processing and Control*. 25, 1-11. ISSN 17468094. Dostupné z: doi:10.1016/j.bspc.2015.10.007  
**IF 2,943**

#### b) bez IF:

1. MALÁ, Šárka, Lucie HOSKOVCOVÁ, Lucie RIEDLBAUCHOVÁ, Tomáš NEDĚLKA a Jan BROŽ, 2018. Relationship Between Cardiac Autonomic Neuropathy and Atherosclerosis in Patients with Diabetes Mellitus. *Current Research in Diabetes and Obesity Journal*. 9(1). ISSN 24761435. Dostupné z: doi:10.19080/CRDOJ.2018.09.555753
2. MALÁ, Šárka, Jan ŠŤOVÍČEK a Milan KVAPIL, 2015. Kardiovaskulární autonomní neuropatie. *Postgraduální medicína*. 17(1), 86-88. ISSN 1212-4184.
3. MALÁ, Šárka, Lucie HOSKOVCOVÁ a Jan ŠŤOVÍČEK, 2017. Možnosti diagnostiky a terapie diabetické autonomní neuropatie. *Acta Medicinae*. 2(6), 80-83. ISSN 1805-398X.
4. KROLLOVÁ, Pavlína, Šárka MALÁ a Milan KVAPIL, 2018. Diabetická neuropatie. *Remedia*. 28(3), 229–234. ISSN 0862-8947.
5. PELECHOVÁ, Barbora, Šárka MALÁ a Milan KVAPIL, 2018. Kardiální autonomní neuropatie - klinické důsledky a možnosti terapie. *Acta Medicinae*. 6(2), 30–31. ISSN 1805-398X.

**c) kapitoly v knize**

1. MALÁ, Šárka a Milan KVAPIL, 2018. Význam kardiální autonomní neuropatie a hodnocení délky QT intervalu v její diagnostice. KVAPIL, Milan, ed. *Diabetologie*. Praha: Triton, s. 315-318. ISBN 978-80-7553-549-8.

**B) Publikace bez vztahu k tématu dizertace:**

**a) s IF:**

1. MAHELKOVÁ, Gabriela, Marie ČESKÁ BURDOVÁ, Šárka MALÁ, Lucie HOSKOVCOVÁ, Dagmar DOTŘELOVÁ a Kateřina ŠTECHOVÁ, 2018. Higher Total Insulin Dose Has Positive Effect on Corneal Nerve Fibers in DM1 Patients. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 59(10), 3800–3807. ISSN 1552-5783. Dostupné z: doi:10.1167/iovs.18-24265  
**IF 3,388**
2. BROŽ, Jan, Šárka MALÁ a Dario RAHELIĆ, 2018. Effects of Roy Adaptation Model Education on Diabetes Care Profile of Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. 20(12). ISSN 2074-1804. Dostupné z: doi:10.5812/ircmj.82744  
**IF 0,786**
3. POTOČKOVÁ, Veronika, Šárka MALÁ, Aleš TOMEK, Daniel BAUMGARTNER a Radim MAZANEC, 2016. Význam testování termických prahů v detekci neuropatie tenkých vláken u diabetiků 1. typu. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. 79(6), 692–697. ISSN 1210-7859.  
**IF 0,355**

**b) bez IF:**

1. PIPKOVÁ, Marcela, Šárka MALÁ, Jan ŠŤOVÍČEK, Marek HONKA a Milan KVAPIL, 2013. Diagnostika poruch evakuace žaludku u diabetiků s diabetickou autonomní neuropatií. *Gastroenterologie a hepatologie*. 67(6), 488–493. ISSN 1804-7874.
2. ŠŤOVÍČEK, Jan, Šárka MALÁ a Marcela PIPKOVÁ. Gastroenterologické problémy pacientů s diabetes mellitus, 2014. *Postgraduální medicína*. 16(4), 384–388. ISSN 1212-4184.



3. ŠŤOVÍČEK, Jan, Šárka MALÁ a Marcela PIPKOVÁ. Diabetická autonomní neuropatie a gastrointestinální trakt, 2015. *Postgraduální medicína*. 17(1), 89–92. ISSN 1212-4184.
4. MALÁ, Šárka, Marcela PIPKOVÁ, Jan ŠŤOVÍČEK, Radan KEIL a Milan KVAPIL. Inkontinence stolice, 2013. *Gastroenterologie a hepatologie*. 67(3), 207–211. ISSN 1804-7874.

**c) kapitoly v knize**

1. MALÁ, Šárka, Marcela PIPKOVÁ a Jan ŠŤOVÍČEK, 2014. Diabetická enteropatie. KVAPIL, Milan, ed. *Diabetologie*. Praha: Triton, s. 217-224. ISBN 978-80-7387-755-2.
2. PIPKOVÁ, Marcela, Šárka MALÁ a Jan ŠŤOVÍČEK, 2014. Symptomy, diagnostika a terapie diabetické autonomní neuropatie horního zažívacího traktu. KVAPIL, Milan, ed. *Diabetologie*. Praha: Triton, s. 211-216. ISBN 978-80-7387-755-2
3. HOSKOVCOVÁ, Lucie, Jan BROŽ a Šárka MALÁ, 2016. Poruchy kognitivních funkcí u diabetes mellitus 1. a 2. typu. KVAPIL, Milan, ed. *Diabetologie*. Praha: Triton, s. 183–199. ISBN 978-80-7553-031-8.

### **13. Přílohy – Nejvýznamnější publikované články s vazbou k dizertační práci**

- 13.1. MALÁ, Šárka, Veronika POTOČKOVÁ, Lucie HOSKOVCOVÁ, et al., 2017. Cardiac autonomic neuropathy may play a role in pathogenesis of atherosclerosis in type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 134, 139-144. ISSN 01688227. Dostupné z: doi:10.1016/j.diabres.2017.10.002 (**IF 3,239**)  
*(disertace strana 111-116)*
- 13.2. SCHLENKER, Jakub, Vladimír SOCHA, Lucie RIEDLBAUCHOVÁ, Tomáš NEDĚLKA, Anna SCHLENKER, Veronika POTOČKOVÁ, Šárka MALÁ a Patrik KUTÍLEK, 2016. Recurrence plot of heart rate variability signal in patients with vasovagal syncope. *Biomedical Signal Processing and Control*. 25, 1-11. ISSN 17468094. Dostupné z: doi:10.1016/j.bspc.2015.10.007 (**IF 2,943**)  
*(disertace strana 117-127)*
- 13.3. MALÁ, Šárka, Lucie HOSKOVCOVÁ, Lucie RIEDLBAUCHOVÁ, Tomáš NEDĚLKA a Jan BROŽ, 2018. Relationship Between Cardiac Autonomic Neuropathy and Atherosclerosis in Patients with Diabetes Mellitus. *Current Research in Diabetes and Obesity Journal*. 9(1). ISSN 24761435. Dostupné z: doi:10.19080/CRDOJ.2018.09.555753  
*(disertace strana 128-132)*



Contents available at ScienceDirect

Diabetes Research  
and Clinical Practicejournal homepage: [www.elsevier.com/locate/diabres](http://www.elsevier.com/locate/diabres)International  
Diabetes  
Federation

# Cardiac autonomic neuropathy may play a role in pathogenesis of atherosclerosis in type 1 diabetes mellitus



Sarka Mala<sup>a,\*</sup>, Veronika Potockova<sup>b</sup>, Lucie Hoskovcova<sup>a</sup>, Paulina Pithova<sup>a</sup>, Marek Brabec<sup>c,d</sup>, Jaroslava Kulhankova<sup>e</sup>, Radan Keil<sup>a</sup>, Lucie Riedlbauchova<sup>f</sup>, Jan Broz<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Internal Medicine Department, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic<sup>b</sup> Department of Neurology, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic<sup>c</sup> Institute of Computer Science, Czech Academy of Science, Prague, Czech Republic<sup>d</sup> Czech Institute of Informatics, Robotics and Cybernetics, Czech Technical University in Prague, Czech Republic<sup>e</sup> Department of Primary Care, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic<sup>f</sup> Department of Cardiology, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 11 July 2017

Received in revised form

22 August 2017

Accepted 2 October 2017

Available online 6 October 2017

### Keywords:

Autonomic neuropathy

Diabetes mellitus

Intima media thickness

Atherosclerosis

Heart rate variability

## ABSTRACT

**Aims:** Cardiac autonomic neuropathy (CAN) is a frequent and severe complication of type 1 diabetes mellitus (T1DM). CAN diagnosis is associated with increased cardiovascular morbidity and mortality, often due to progressive atherosclerosis. Carotid intima media thickness (CIMT) is a surrogate marker of the atherosclerosis. The aim of our study was to evaluate the relationship between CIMT and CAN in T1DM patients.

**Methods:** Total of 49 T1DM patients and 45 healthy controls were examined for CAN presence and CIMT. CAN was diagnosed based on the results of Ewing test battery and spectral analysis of heart rate variability. CIMT was measured by two-dimensional ultrasound. Biochemical, anthropometric and anamnestic risk markers of atherosclerosis were evaluated. We used logistic types of generalized additive models (GAM) for statistical analysis.

**Results:** CAN was detected in 22 out of 49 T1DM patients (45%). All 45 healthy controls had normal cardiovascular autonomic tests results. CIMT was significantly positively associated with T1DM diagnosis ( $p = 0.0251$ ), CAN diagnosis ( $p = 0.007$ ), age ( $p < 0.0001$ ), BMI ( $p = 0.0435$ ) and systolic blood pressure ( $p = 0.0098$ ). CAN effect on CIMT interacted with the effect of T1DM. The combination of both factors significantly increased CIMT more than the sum of the individual T1DM and CAN status.

**Conclusions:** CAN is significantly associated with higher CIMT in T1DM patients. CAN may play a role in pathogenesis of atherosclerosis in type 1 diabetes mellitus.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Cardiovascular autonomic neuropathy (CAN) is a frequent and serious complication of diabetes mellitus. CAN is present

in up to one fifth of diabetic patients [1]. CAN occurrence in diabetic patients is associated with a 4-fold increase in mortality [2], and a higher prevalence of silent myocardial ischemia as well as systolic and diastolic left ventricular

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [sarkamal@seznam.cz](mailto:sarkamal@seznam.cz), [Sarka.Mala@fnmotol.cz](mailto:Sarka.Mala@fnmotol.cz) (S. Mala).<https://doi.org/10.1016/j.diabres.2017.10.002>

0168-8227/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

dysfunction [3,4]. Because of hemodynamic instability, patients with CAN have a higher risk of anesthesia-related complications, and higher perioperative morbidity and mortality [1,5,6]. This type of cardiac innervation impairment increases the risk of malignant arrhythmias and sudden cardiac death [7]. The influence of CAN on the arterial hypertension development is also discussed. Typically, a drop in blood pressure (i.e. nocturnal dipping, which is at least a 10% drop in comparison to average daily blood pressure values), along with a decreased heart rate, occurs during sleep in healthy individuals. This happens physiologically as a result of the higher tone of the vagal nerve during a sleep period. In the early stages of CAN, vagal nerve dysfunction is often detected (i.e. the reduction of respiratory arrhythmia during deep breathing tests). This predominant involvement of parasympathetic nerve fibers activation in subclinical stages of CAN, may play a role in the development of blood pressure non-dipping in patients with diabetes mellitus, which can lead to the dysfunction of many internal organs [8–11].

Several studies suggest that reduced heart rate variability and the presence of CAN could contribute to the development and progression of atherosclerosis in patients with diabetes mellitus [12–17]. Carotid intima media thickness (CIMT) is a surrogate marker of atherosclerosis. The aim of our study was therefore to evaluate whether there is an association between presence of CAN and CIMT in T1DM patients.

## 2. Subjects, materials and methods

### 2.1. Study subjects

The study enrolled men and women older than 19-years, who were willing and able to participate in the study. All subjects were examined during the years 2015–2017. Patients with T1DM that have been followed in our outpatient clinic for several years have been addressed. We primarily focused on those T1DM patients with a higher suspicion of having CAN (resting tachycardia, a diagnosis of diabetes mellitus with at least 5 years' duration, presence of diabetic neuropathy...). The control group of patients consisted of healthy volunteers without diabetes mellitus, thyreopathy. Control subjects with a presence of non-diabetic peripheral neuropathy ( $n = 3$ ) were excluded.

Exclusion criteria were cancer, an acute infection, history of coronary artery disease (as myocardial infarction or angina). Each participant of the study was familiar with all the examination details and purposes of the study and signed an informed consent document. The study was approved by the Ethics Committee of University Hospital Motol in Prague.

### 2.2. General examination and microvascular complications evaluation

Weight and height of all subjects was measured by calibrated device, body mass index (BMI) was calculated as weight in kilograms divided by height in square meters. As for smokers, we identified persons currently smoking or with a history of smoking. Blood pressure was measured by calibrated tonome-

ter after 10 min of rest and expressed as a mean value calculated from 2 measurements on both upper extremities. Biochemical markers (parameters of kidney function, thyroid gland, lipid spectrum, glucose metabolism, nutrition) were evaluated from fasting blood samples by the certified laboratory of University Hospital Motol.

A detailed medical history was taken from all the study subjects. In T1DM patients, duration of diabetes mellitus and the presence of microvascular complications were noted. All T1DM patients had ophtalmological examination of the fundus in the last 12 months before the inclusion to the study. History of diabetic nephropathy or microalbuminuria (MAU) tested from morning urine higher than 2.5 mg/mmol creatinin was searched in addition. The presence of peripheral neuropathy was examined according to the recommendation of the American Diabetes Association [18]. We used 10 g nylon Semmes Weinstein monofilament for testing; vibration thresholds were determined by a calibrated biothesiometer. Small thermal fiber neuropathy was evaluated by Thermal Threshold Testing using normal values for Czech population [19].

### 2.3. Cardiac autonomic neuropathy testing

All study subjects were examined for the presence of cardiac autonomic neuropathy in the Neurophysiology Laboratory of University Hospital Motol. The evaluation of heart rate variability (HRV) according to the recommendations of the European Society of Cardiology was performed [8]. The examination was done under standardized conditions (quiet room, between 7 and 12 am, absence of acute infection and hypoglycemia, 24-h withdrawal of beta blockers, antidepressants and diuretics) by FAN device (Schwarzer, Germany). 4 parameters of cardiovascular autonomic reflex tests (CART) and 3 parameters of Power spectrum analysis of heart rate variability (PSAHRV) were evaluated. CARTs values (E: I ratio during deep breathing with a controlled frequency of 6 breaths per minute, Valsalva ratio during Valsalva test against 40 mmHg air resistance, Ewing 30:15 and an orthostatic drop in systolic blood pressure obtained during orthostatic test – 5 min lying, 5 min standing) were compared with the standards by the American Diabetes Association [17]. PSAHRV values (LF power, HF power, Total power) obtained during an orthostatic test were compared to age-related normal values for the Czech population [20]. The presence of CAN was determined as the presence of 2 or more pathological test results.

### 2.4. Carotid atherosclerosis measurement

The measurement of the common carotid artery intima media thickness (CIMT) was done by one skilled angiologist. The examination was performed by an ultrasound device (Toshiba Nemio MX, Japan) with a Toshiba PLN-805AT linear array ultrasound transducer probe (frequency range of 6.0 to 12.0 MHz). CIMT values were obtained from common carotid artery at 1 cm distance from carotid bulb on the far wall. The mean value was calculated from two values on both sides (4 values in total) for statistical analysis.



### 2.5. Statistical analysis

For statistical analysis, we used logistic type of generalized additive models (GAM). This method was used as a generalization of standard multiple regression in order to cope with both the binary nature of the response and potentially nonlinear effects of some explanatory variables. Potentially nonlinear relationships were modeled using penalized splines (with roughness penalty estimated via cross validation). A  $p < 0.05$  was considered significant.

### 3. Results

A total of 49 T1DM patients and 45 non-diabetic controls were enrolled to the study. CAN was diagnosed in 22 T1DM patients, all non-diabetic controls had normal CART results. Basic characteristics of the examined groups are summarized in the following table. (Table 1).

For the basic semiparametric regression model, we denoted CIMT value as a dependent variable. We studied the dependence of CIMT on the following variables: age, BMI, T1DM diagnosis, duration of diabetes, CAN diagnosis. We found a significant positive correlation of CIMT with age ( $p < 0.0001$ ) – the effect of age to CIMT did not seem to be nonlinear (Fig. 1). The correlation between CIMT and BMI ( $p = 0.0435$ ) was nonlinear (the biggest difference of CIMT values was in the range of BMI between 27 and 37) (Fig. 2). We did not prove a correlation of CIMT and duration of diabetes ( $p = 0.9940$ ). We found a significant correlation of CIMT with T1DM diagnosis ( $p = 0.0251$ ) and CAN diagnosis ( $p = 0.0009$ ). We found an interaction of T1DM and CAN diagnosis status meaning that the combination effect of T1DM and CAN diagnosis increased CIMT more than the sum of separate effects of T1DM and CAN status.

In order to check the possibility that the effect of CAN on CIMT, which we have demonstrated in the basic model, could have been caused by other variables, we performed an addi-

tional sensitivity analysis, where we used CIMT value as a dependent variable (as in the previous model) and T1DM, CAN diagnosis, age, BMI and on added risk factors of atherosclerosis – LDL cholesterol level, the atherogenic index (AI - the ratio of total cholesterol: HDL cholesterol), systolic blood pressure (sBP), diastolic blood pressure (dBP), and past or current smoking or non-smoking lifestyle as explanatory variables.

In this expanded regression model, we found a significant influence of systolic blood pressure to CIMT ( $p = 0.0098$ ). However, the effect of CAN diagnosis on CIMT was still significant ( $p = 0.007$ ). The expanded model (which considered the effects of LDL, AI, sBP, dBP, smoking) calculated these hypothetical mean values of CIMT depending on CAN and T1DM diagnosis (Fig. 3).

### 4. Discussion

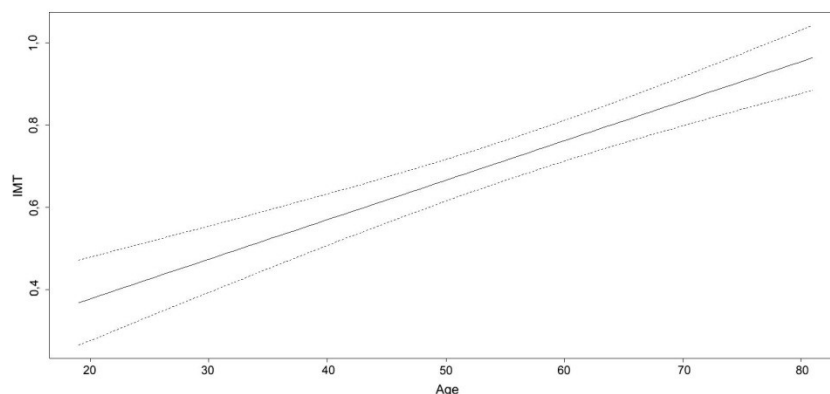
The meta-analysis of Sun et al. [21] from 2015 showed that patients with type 1 diabetes mellitus have higher carotid intima-media thickness in comparison to the non-diabetic population, which is in correlation with our results. An increased CIMT level in T1DM patients may demonstrate a higher risk of cardiovascular events [21]. Macro-vascular complications are the main cause of morbidity and mortality in diabetes mellitus patients [22]. But the mechanisms by which diabetes mellitus accelerates cardiovascular disease are not entirely clear [22].

The work by Colhoun et al. from 2001 [23] suggests that coronary artery calcification is, in T1DM patients, associated with reduced heart-rate variability. In 2010 Rodrigues et al. [16] published a study which showed that reduced heart-rate variability may be a predictor of progression of coronary artery calcification in adults with type 1 diabetes mellitus. Jung et al. [13] demonstrated in 2013 the association of cardiac autonomic neuropathy and CIMT in patients with type 2 diabetes mellitus.

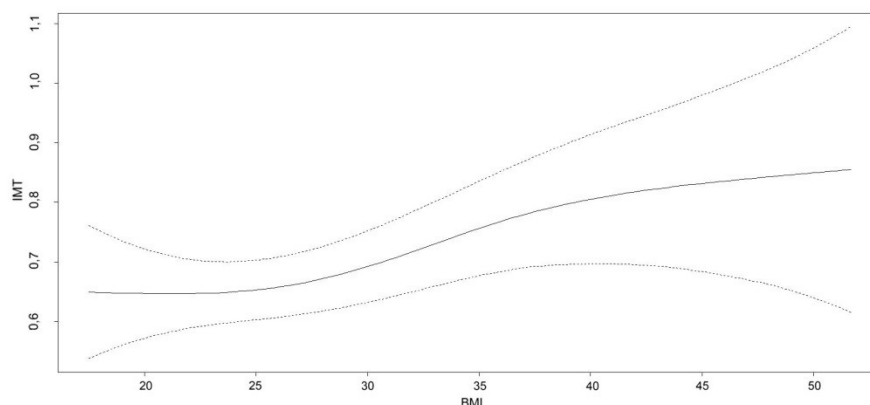
**Table 1 – General characteristics of the study subjects according to cardiac autonomic neuropathy presence.**

Study groups	T1DM patients (n = 49)		Non diabetic controls (n = 45)	
	With CAN (n = 22)	Without CAN (n = 27)		
Sex female/male	10/12	15/12	28/17	
Age	44.8 (10)	44.4 (15)	54.9 (11)	years
Duration of diabetes mellitus	28.7 (12)	24.2 (12)		
BMI	26.1 (4.2)	26.5 (7.9)	26.8 (4.3)	kg/m <sup>2</sup>
Systolic blood pressure	135 (19)	130 (13)	127 (14)	mmHg
Diastolic blood pressure	79 (9)	74 (7)	76 (7)	mmHg
HbA1C IFCC	71 (16)	70 (17)	38 (3)	mmol/mol
HbA1C DCCT	8.7 (1.5)	8.6 (1.6)	5.6 (0.3)	%
Total cholesterol	4.4 (0.8)	4.8 (1.0)	5.4 (1.0)	mmol/l
	168 (33)	184 (38)	209 (39)	mg/dl
HDL	1.29 (0.3)	1.5 (0.5)	1.5 (0.4)	mmol/l
	50 (12)	58 (18)	57 (15)	mg/dl
LDL	2.4 (0.7)	2.6 (0.8)	3.1 (0.9)	mmol/l
	90 (27)	100 (31)	120 (34)	mg/dl
TAG	1.3 (0.8)	1.1 (0.5)	1.3 (0.6)	mmol/l
	112 (70)	96 (46)	117 (52)	mg/dl
CIMT	0.88 (0.29)	0.73 (0.18)	0.73 (0.15)	mm

Values are expressed as mean (SD).



**Fig. 1** – The values of CIMT related to age estimated by the basic regression model for a situation without T1DM and without CAN. The solid line shows an estimation of mean value, and dotted lines shows border marks of the constructed 95% confidence interval.



**Fig. 2** – The values of CIMT related to BMI estimated by the basic regression model for a situation without T1DM and without CAN. The solid line shows an estimation of mean value, and dotted lines show border marks of the constructed 95% confidence interval.

Our work assessed the influence of CAN diagnosis on carotid intima-media thickness in T1DM patients using semi-parametric regression models. For CAN evaluation, we used Ewing battery of tests and age related normal values of spectral analysis of heart-rate variability. We are not aware of a similar study having been published in the past.

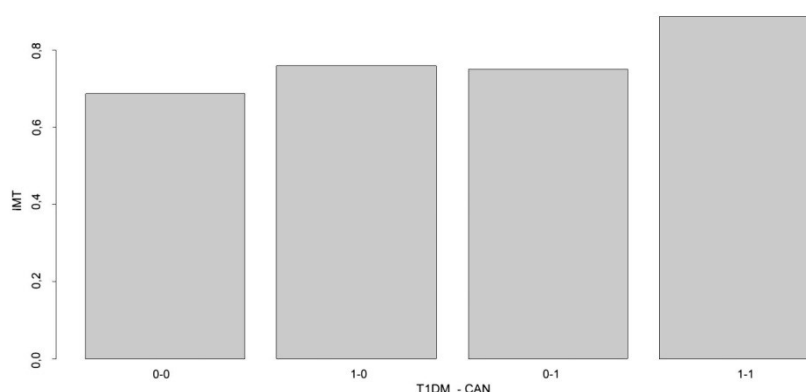
We demonstrated the association of age, BMI, systolic blood pressure, T1DM and CAN diagnosis with CIMT. We showed a significant effect of CAN diagnosis on CIMT, independently of known risk factors of atherosclerosis. This finding suggests that cardiac autonomic neuropathy could play a role in the pathogenesis of carotid atherosclerosis in T1DM patients. However, the exact mechanism through which CAN promotes atherosclerotic process is not clear.

Experimental studies showed that the autonomic nervous system could modulate the systemic inflammatory response through the cholinergic anti-inflammatory pathway [24,25].

Rodrigues et al. [16] suggested that cardiac autonomic neuropathy leading to pro-inflammatory state could represent one pathway through which traditional risk factors trigger the atherosclerosis development.

It is also known that from early stages of CAN, parasympathetic nerve fiber dysfunction leads to blood pressure non-dipping over the night period [9,11]. The relative over toning of the sympathetic nervous system and exposure to higher blood pressure during the sleep cycle can theoretically lead to arterial vessel damage and accelerate atherosclerosis. This hypothesis can be supported by results of Cuspidi et al. [26] who proved in their meta-analysis the association between nondipping pattern and increased risk of subclinical carotid atherosclerosis.

Nevertheless, more studies are required to confirm whether and how cardiac autonomic neuropathy contributes to atherosclerosis development.



**Fig. 3 – The calculated mean values of CIMT depending on the presence of T1DM and CAN (based on mean values of continuous covariates of the expanded model). Values under the columns demonstrate the hypothetical presence of T1DM and CAN, the value on the left corresponds to the presence of T1DM (0 – without T1DM 1 – with T1DM), the value on the right corresponds to the CAN diagnosis (0 – without CAN 1 – with CAN).**

### Acknowledgments

S.M. designed and conducted the study, performed the analysis and wrote the manuscript. V.P., L.H., J.K. and P.P. contributed to the design and conduct of the study, and revised the manuscript. M.B. was in charge of statistical analyses and analyzed this work, and revised the manuscript. R.K. contributed to design of the study and statistical analysis, and revised the manuscript. L.R. contributed to design of the study and statistical analysis, and revised the manuscript. J.B. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

### Conflict of interest

The authors do not have any conflicts of interest to declare.

This article was supported by Ministry of Health, Czech Republic – conceptual development of research organization, Motol University Hospital, Prague, Czech Republic 00064203.

The work was presented in a poster section in April 2017 at 53rd Diabetological Days in Luhacovice, Czech Republic.

### REFERENCES

- [1] Spallone V, Ziegler D, Freeman R, et al. Cardiovascular autonomic neuropathy in diabetes: clinical impact, assessment, diagnosis, and management. *Diabetes/Metabol Res Rev* 2011;27(7):639–53. <https://doi.org/10.1002/dmrr.1239>.
- [2] Maser RE, Mitchell BD, Vinik AI, Freeman R. The association between cardiovascular autonomic neuropathy and mortality in individuals with diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care* 2003;26(6):1895–901. <https://doi.org/10.2337/diacare.26.6.1895>.
- [3] Vinik AI, Maser RE, Mitchell BD, Freeman R. Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care* 2003;26(5):1553–79. <https://doi.org/10.2337/diacare.26.5.1553>.
- [4] Vinik AI, Ziegler D. Diabetic cardiovascular autonomic neuropathy. *Circulation* 2007;115(3):387–97. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.106.634949>.
- [5] Oakley I, Emond L. Diabetic cardiac autonomic neuropathy and anesthetic management: review of the literature. *AANA J* 2011;79(6):473–9. Available from: [http://www.aana.com/newsandjournal/Documents/diabeticcardiac\\_1211\\_p473-479.pdf](http://www.aana.com/newsandjournal/Documents/diabeticcardiac_1211_p473-479.pdf).
- [6] Huang C-J, Kuok C-H, Kuo TBJ, Hsu Y-W, Tsai P-S. Pre-operative measurement of heart rate variability predicts hypotension during general anesthesia. *Acta Anaesthesiol Scand* 2006;50(5):542–8. <https://doi.org/10.1111/j.1399-6576.2006.001016.x>.
- [7] Ewing DJ, Boland O, Neilson JMM, Cho CG, Clarke BF. Autonomic neuropathy, QT interval lengthening, and unexpected deaths in male diabetic patients. *Diabetologia* 1991;34(3):182–5. <https://doi.org/10.1007/bf00418273>.
- [8] T. F. O. T. E. S. O. C. T. N. A. S. Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Circulation* 1996;93(5):1043–1065. <https://doi.org/10.1161/01.cir.93.5.1043>.
- [9] Spallone V, Maiello MR, Cicconetti E, et al. Factors determining the 24-h blood pressure profile in normotensive patients with type 1 and type 2 diabetes. *J Hum Hypertens* 2001;15(4):239–46. <https://doi.org/10.1038/sj.jhh.1001170>.
- [10] Hjortkær H, Jensen T, Kofoed K, et al. Nocturnal antihypertensive treatment in patients with type 1 diabetes with autonomic neuropathy and non-dipping of blood pressure during night time: protocol for a randomised, placebo-controlled, double-blind, two-way crossover study: Table 1. *BMJ Open* 2014;4(10). <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2014-006142>.
- [11] Perk G, Mekler J, Ishay DB, Bursztyn M. Non-dipping in diabetic patients: insights from the siesta. *J Hum Hypertens* 2002;16(6):435–8. <https://doi.org/10.1038/sj.jhh.1001412>.
- [12] Fakhrzadeh H, Yamini-Sharif A, Sharifi F, et al. Cardiac autonomic neuropathy measured by heart rate variability and markers of subclinical atherosclerosis in early type 2



- diabetes. *ISRN Endocrinol* 2012;2012:1–7. <https://doi.org/10.5402/2012/168264>.
- [13] Jung C-H, Baek A-R, Kim K-J, et al. Association between cardiac autonomic neuropathy, diabetic retinopathy and carotid atherosclerosis in patients with type 2 diabetes. *Endocrinol Metabol* 2013;28(4):309. <https://doi.org/10.3803/enm.2013.28.4.309>.
- [14] Canani LH, Copstein E, Pecis M, et al. Cardiovascular autonomic neuropathy in type 2 diabetes mellitus patients with peripheral artery disease. *Diabetol Metabol Syndrome* 2013;5(1):54. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-5-54>.
- [15] Meyer C, Milat F, Mcgrath BP, Cameron J, Kotsopoulos D, Teede HJ. Vascular dysfunction and autonomic neuropathy in type 2 diabetes. *Diabet Med* 2004;21(7):746–51. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2004.01241.x>.
- [16] Rodrigues TC, Ehrlich J, Hunter CM, Kinney GL, Rewers M, Snell-Bergeon JK. Reduced heart rate variability predicts progression of coronary artery calcification in adults with type 1 diabetes and controls without diabetes. *Diabetes Technol Therap* 2010;12(12):963–9. <https://doi.org/10.1089/dia.2010.0070>.
- [17] Dayem SMAE, Battah AA, Bohy AEME. Cardiovascular autonomic neuropathy and early atherosclerosis in adolescent type 1 diabetic patient. *Open Access Macedonian J Med Sci* 2015. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4877908/> [accessed August 17, 2017].
- [18] Boulton AJ, Vinik AI, Arezzo JC, et al. Diabetic neuropathies: a statement by the american diabetes association. *Diabetes Care* 2005;28(4):956–62. <https://doi.org/10.2337/diacare.28.4.956>.
- [19] Bursova S, Vlckova E, Hnojckikova M, Nemec M, Micankova Adamova B, Bednarik J. The Computer-Assisted Quantitative Sensory Testing – Normative Data. *Cesk Slov Neurol N* 2012;75/108(4):444–453. [http://www.csnn.eu/ceska-slovenska-neurologie-clanek/pristrojove-asistovane-kvantitativni-testovani-senzitivita-normativni-data-38433?confirm\\_rules=1](http://www.csnn.eu/ceska-slovenska-neurologie-clanek/pristrojove-asistovane-kvantitativni-testovani-senzitivita-normativni-data-38433?confirm_rules=1).
- [20] Vlckova E, Bednarik J, Bursova S, Sajgalikova K, Mlcakova L. Spectral analysis of heart rate variability – in quest of normative data. *Cesk Slov Neurol N* 2010;73:68–72. Available from: [https://is.muni.cz/th/23834/lf\\_d\\_b1/Vlckova\\_SAHRV\\_CSN2010.pdf](https://is.muni.cz/th/23834/lf_d_b1/Vlckova_SAHRV_CSN2010.pdf).
- [21] Sun Y-P, Cai Y-Y, Li H-M, Deng S-M, Leng R-X, Pan H-F. Increased carotid intima-media thickness (CIMT) levels in patients with type 1 diabetes mellitus (T1DM): a meta-analysis. *J Diabetes Complications* 2015;29(5):724–30. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2015.03.018>.
- [22] Lopes-Virella MF, Mchenry MB, Lipsitz S, et al. Immune complexes containing modified lipoproteins are related to the progression of internal carotid intima-media thickness in patients with type 1 diabetes. *Atherosclerosis* 2007;190(2):359–69. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.02.007>.
- [23] Colhoun HM, Francis DP, Rubens MB, Underwood SR, Fuller JH. The association of heart-rate variability with cardiovascular risk factors and coronary artery calcification: a study in type 1 diabetic patients and the general population. *Diabetes Care* 2001;24(6):1108–14. <https://doi.org/10.2337/diacare.24.6.1108>.
- [24] Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000;405(6785):458–62. <https://doi.org/10.1038/35013070>.
- [25] Wang H, Yu M, Ochani M, et al. Nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 2002;421(6921):384–8. <https://doi.org/10.1038/nature01339>.
- [26] Cuspidi C, Sala C, Tadic M, Gherbesi E, Grassi G, Mancia G. Nondipping pattern and carotid atherosclerosis. *J Hypertens* 2016;34(3):385–92. <https://doi.org/10.1097/hjh.0000000000000812>.





## Recurrence plot of heart rate variability signal in patients with vasovagal syncope



Jakub Schlenker<sup>a,\*</sup>, Vladimír Socha<sup>a</sup>, Lucie Riedlbauchová<sup>b</sup>, Tomáš Nedělka<sup>c</sup>, Anna Schlenker<sup>d</sup>, Veronika Potočková<sup>c</sup>, Šárka Malá<sup>c</sup>, Patrik Kutílek<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Biomedical Engineering, Czech Technical University, Nám. Sítná 3105, 272 01 Kladno, Czech Republic

<sup>b</sup> 2nd Faculty of Medicine of the Charles University and University Hospital Motol, Clinic of Cardiology, Department for Electrophysiology and Cardiac Pacing, V Úvalu 84, 150 06 Prague, Czech Republic

<sup>c</sup> 2nd Faculty of Medicine of the Charles University and University Hospital Motol, Department of Neurology, V Úvalu 84, 150 06 Prague, Czech Republic

<sup>d</sup> 1st Faculty of Medicine of the Charles University and General University Hospital, Institute of Hygiene and Epidemiology, Studničkova 7, 128 00 Prague, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 2 March 2015

Received in revised form 17 October 2015

Accepted 22 October 2015

Available online 18 November 2015

#### Keywords:

Recurrence analysis

Recurrence plot

Heart rate variability

Vasovagal syncope

Nonlinear analysis

### ABSTRACT

Currently, heart rate variability (HRV) is commonly evaluated using time and frequency domain analysis in the clinical practice. Due to the fact that cardiovascular system is regulated by the autonomic nervous system (ANS) that also influences HRV, however exhibits rather nonlinear behaviour, it appears more appropriate to apply nonlinear methods to evaluate functioning of ANS. This study presents recurrence analysis as a tool to test the presence of ANS dysfunction that is responsible i.e. for orthostatic (vasovagal) syncope by which abnormal HRV has been demonstrated in the past.

Study included 18 patients that experienced vasovagal syncope (mean age  $23.7 \pm 5.2$  years) and 18 healthy subjects (mean age  $24.5 \pm 3.2$ ,  $p=0.85$ ). In all tested subjects, ECG recording was performed during active orthostatic test that comprised two phases (5 min of resting in a supine position and 5 min of active standing). Sequence of R-R intervals (time intervals between two consecutive heart beats derived from ECG) was analysed using standard time (mean RR, mean HR, SDNN, SDHR, RMSSD, NN50 and pNN50) and frequency domain (LF, HF and LF/HF ratio) analysis. Moreover, recurrence analysis was performed (RATIO, DIV, AVDL, MAXV, DET, ENTR, LMAX, TT and LAM).

Frequency domain analysis did not demonstrate significant difference between the two groups in any of the parameters during both phases of the test. On the contrary, both time domain analysis and recurrence analysis showed comparable findings in both groups during resting phase of the orthostatic test with a significant change of most tested parameters after stand-up.

As the use of time domain HRV may be perceived as problematic regarding their interpretation in short ECG recordings, recurrence analysis appears to be a sensitive tool for detecting ANS dysfunction in patients with vasovagal syncope.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Currently, the field of medicine is experiencing a rising tendency towards the use of nonlinear methods derived from chaos

theory [1–3] that describe the dynamics of a system [4]. What makes nonlinear methods so widely used nowadays is their ability to describe certain ongoing processes in the organism more precisely than a range of other methods [5] that are currently used in medicine.

Every living organism shows signs of chaotic behaviour ranging from sub-cellular level to vital regulations, such as heart rate and blood pressure [4]. Since dysregulation of the latter may prove pathological and yields significant clinical consequences, measurement and evaluation of heart rate and blood pressure behaviour are particularly instrumental and important in clinical practice. Their dysregulation may be caused by abnormal autonomic

\* Corresponding author. Tel.: +420 224358425.

E-mail addresses:

[jakub.schlenker@gmail.com](mailto:jakub.schlenker@gmail.com) (J. Schlenker), [vladimir.socha@fbmi.cvut.cz](mailto:vladimir.socha@fbmi.cvut.cz) (V. Socha), [Lucie.Riedlbauchova@fnmotol.cz](mailto:Lucie.Riedlbauchova@fnmotol.cz) (L. Riedlbauchová), [nedelka@post.cz](mailto:nedelka@post.cz) (T. Nedělka), [schlenker.anna@gmail.com](mailto:schlenker.anna@gmail.com) (A. Schlenker), [Veronika.Potockova@fnmotol.cz](mailto:Veronika.Potockova@fnmotol.cz) (V. Potočková), [Sarka.Mala@fnmotol.cz](mailto:Sarka.Mala@fnmotol.cz) (Š. Malá), [kutilek@fbmi.cvut.cz](mailto:kutilek@fbmi.cvut.cz) (P. Kutílek).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bspc.2015.10.007>

1746-8094/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

nervous system (ANS) regulation, as in the case of vasovagal syncope [6]. Dysregulated oscillation activity of ANS in vasovagal syncope is related to hemodynamic changes that lead to sudden occurrence of bradycardia and hypotension resulting in loss of consciousness and collapse of a patient although there is no structural heart disease present. The most frequent provoking factor resulting in syncope is orthostasis that leads to blood concentration in lower limb vessels in sensitive individuals. This blood redistribution in the vascular space causes lower blood filling of the heart with resulting activation of baroreceptors in the aortic arch and carotic sinus. Consequently, sympathetic division of ANS is activated, which results in increased heart rate and diastolic pressure [7]. However, in patients with vasovagal syncope, no increase of sympathetic division activity occurs. Thus blood pressure decreases as a result of diminished ventricular filling and excessive activity of parasympathicus (the other part of ANS) causes bradycardia through mechanoreceptors in pulmonary artery, atrial walls and left ventricle [8]. In fact, vasovagal syncope is not a rare disease and falls among the most common causes of fainting, black-outs, sudden falls and short term loss of consciousness.

Autonomic nervous system, perceived as a fine example of non-linear deterministic system [4,9,10], influences heart rate and blood pressure in order to secure proper functioning of all organs based on the state of the body. A constant and balanced tone between sympathetic and parasympathicus is responsible for adequate blood pressure and heart rate that reflects an actual hemodynamic need. Thus, ANS functioning can be partly studied using heart rate variability (HRV), an analysis of heart rate changes over time, which reflects the heart's ability to react to the changes of ANS tone [11].

Clinical assumption on vasovagal aetiology of syncope is verified in a defined test that aims to de-mask presence of ANS dysfunction under the heading of so-called orthostatic test. There are two different methods of orthostatic testing, first is active standing and second is head-up tilt test (HUTT) [12,13].

ANS system dysfunction is believed to be present when blood pressure and/or heart rate suddenly decreases during stand-up phase of the test which is usually associated with manifestation of typical clinical symptoms/syncope. However, HRV analysis has proven to better identify and measure autonomic dysregulation responsible for heart rate and blood pressure changes before they manifest themselves in the form of a syncope. Actually, HRV has been known to be an effective tool for the prediction of cardiovascular morbidity and mortality [14–16]. For HRV evaluation, there are commonly used linear methods of analysis (based on time and frequency domain analysis) as well as nonlinear methods [14,17,3,18]. However, linear methods that are based on fast Fourier transform and autoregressive model proved to have a number of disadvantages [10]. Frequency domain also yields disadvantages such as long sessions of obtaining data, non-stationarity, lower sensitivity as well as high sensitivity to noise. On the other hand, recurrence analysis as a new and promising approach to HRV assessment seems to be able to tackle these obstacles relying on the observation that a healthy subject's ANS immediately responds to impulses of the organism resulting in lower occurrence of the same or similar states. In contrast, since autonomic dysfunction causes a significant simplification of bodily functions control (including heart rate variability), similar states recur more frequently. Recurrence analysis seemed to be promising in pilot studies as an effective non-linear technique capable of presenting discrete abnormalities in heart rate regulation in earlier stages of the autonomic dysfunction [9,19–23].

This work primarily aims to verify relevance of recurrence analysis in the detection of ANS regulation disorders that result in vasovagal syncope.

**Table 1**  
Study groups characteristics.

	Control group	Syncope group	The significance level
Mean age (years)	24.5 ± 3.2	23.7 ± 5.2	0.8493
Maximal age (years)	33	33	–
Minimal age (years)	20	15	–
Sex (male/female)	9/9	2/16	0.0477

## 2. Methods

### 2.1. Participants and measuring procedure

Two groups were formed with the total of 36 subjects. Eighteen patients, 16 women and 2 men, aged 15–33 years (mean age 23.7 ± 5.2 years), suffering from vasovagal syncope comprised the Syncope group. The second, Control group comprised of 18 healthy subjects, 9 women and 9 men, aged 20–33 years (mean age 24.5 ± 3.2 years), see Table 1. None of the subjects had history of cardiovascular disease or other disorders. All subjects participating in this study gave their informed consent with the examination.

Active standing test (including resting supine position phase lasting 5 min and standing position phase of the same duration) was used for this study. Subjects were instructed to avoid alcohol, caffeine and nicotine consumption for at least 12 h prior to examination. In our autonomic laboratory, heart rate variability recordings were assessed under standard conditions. We assessed short-term recordings between 10 a.m. and 12 a.m., and patients remained in supine rest 15 min before recording. Then the 5 min supine rest phase was recorded. For the standing phase, patients were instructed to stand up. To prevent artifacts from muscular contraction, the stand-up phase measurement was initiated after the patient was fully adapted to standing position (usually 10–15 s after standing up) and then the 5 min standing phase was recorded. We did not use paced breathing as it was considered less physiological than normal breathing, however, patients were instructed to breath comfortably without changing breathing frequency after changing the position of their body. According to literature [24,25], we absolutely agree that short term heart indices are subject to high variation and their reliability is still discussed in literature. We are trying to achieve similar conditions (i.e. time of examination, room temperature, humidity, absence of unwanted noise, etc.) to minimize those variations. During the entire test, ECG and blood pressure were recorded in both phases and sequence of R-R intervals (intervals between two consecutive heart beats) was subsequently derived from ECG recording. This series of R-R intervals was then analysed using Schwarzer FAN Study (FAN®, Schwarzer, Germany) system and HRV analysis was performed in accordance with standard measurement techniques and algorithms [26–28].

### 2.2. Data analysis

Specifically, sequence of R-R intervals has been analysed using standard time and frequency domain analysis. In addition, recurrence analysis was subsequently performed. In case of the former, following parameters were calculated: mean R-R, mean heart rate (HR), standard deviation for R-R intervals (SDNN), standard deviation for heart rate (SDHR), root mean square of the successive differences for R-R intervals (RMSSD), the sum of all R-R intervals occurring more than 50 ms from each other (NN50), percentual representation of NN50 occurrence in the total sum of R-R intervals (pNN50). Parameters derived from geometric methods (Triangular interpolation of N-N intervals and HRV triangular index) were not evaluated, as they are not suitable for short-term 5-min records [14,29].



For direct evaluation of sympathovagal activity, spectral analysis of measured R-R intervals was selected. Kubios® software was used with this regard [30]. This type of analysis distinguishes between three basic bands, which describe the behaviour of the autonomic nervous system. There is the very low frequency (VLF) band (0.0033–0.04 Hz) indicating the overall activity of various slow sympathetic functional mechanisms, the low frequency (LF) band (0.04–0.15 Hz) reflecting both the activity of sympathetic and that of parasympathetic (but generally being a major indicator of sympathetic activity), and the high frequency (HF) band (0.15–0.40 Hz) which on the other hand reflects vagal activity (i.e. parasympathetic) [14,31–33]. Power values in individual bands were calculated by integrating respective sequences. Parameters used for further evaluation include power values in LF, HF and LF/HF ratio which indicates balance between sympathetic and parasympathetic. These parameters were used in previous studies focused on vasovagal syncope evaluation [34,29,35].

The same sequence of R-R interval was then analysed using recurrent analysis, methodology of which is described in detail below.

### 2.2.1. Phase space reconstruction

Recurrence analysis starts with phase space reconstruction, for which the length of R-R intervals was used as an input signal. Every given point in the space phase represents a certain state of the system. The most commonly used method for phase space reconstruction is time delay embedding based on Takens' theorem [2,36,37].

State variables can be used to describe the state of a system. They form vectors which represent a trajectory in phase space, which is  $N$ -dimensional for  $N$  state variables. On one hand, it is often impossible to observe more than one state variable of a system [2], since they are either unknown or difficult to measure. Using the Takens' theorem [2], however enables us to reconstruct a phase space trajectory from a single observation:

$$x_i = (y_i, y_{i+\tau}, \dots, y_{i+(m-1)\tau})^T, \quad (1)$$

in which  $m$  is the embedding dimension,  $\tau$  is the time delay and  $y_i$  is a single observation,  $T$  is period.

Literature offers a range of various approaches when choosing time delay and dimension [36]. To describe system dynamics fully using phase space reconstruction, an accurate set of these parameters is required [36].

The distance between neighboring elements is given by the time delay. Small state difference is determined by a small time delay, and vice versa, large time delays represent states which can be evaluated as independent. Autocorrelation function is one of the older methods for choosing time delay [38,36], however the possibility of nonlinear processes is not taken into account by this method. The accurate criterion for choosing time delay, as latest studies suggest, is mutual information function [36,38,39], which enables to measure mutual dependence of two random variables. The most suitable way for choosing time delay for space portraits is the first minimum of mutual information [39]. Using entropy, the mutual information of two variables can be defined as follows [39]:

$$I(A, B) = H(A) + H(B) - H(A, B), \quad (2)$$

in which  $H(A)$  and  $H(B)$  are the entropies and  $H(A, B)$  is the joint entropy of  $A$  and  $B$ .

An optimal embedding dimension is required right after the selection of an optimal time delay. It reflects number of the reconstructed shape space dimensions [36]. False nearest neighbor method represents one of the methods used to set optimal embedding dimension, and it proceeds from an observation that the selection of low embedding dimension results in crossing of phase space trajectory [36], representing a situation when points which

are distant from each other in original phase space become closer in reconstructed phase space [40]. Modified false nearest neighbour method was introduced by Cao [40,36,41].

A custom designed MATLAB script (MATLAB R2013a, MathWorks, Inc., Natick, MA, USA) was used in this study. Cao's modified method of false nearest neighbour [40], and method of first minimum of mutual information function [39] (to obtain optimal time delay) were used in this work as well.

### 2.2.2. Recurrence analysis

The objective of recurrence analysis is the comparison of all possible states in the phase space trajectory. It primarily uses recurrence plot (RP), which is able to represent recurrences in a dynamic system graphically (see Fig. 1). RPs are used both to identify interrelations between different systems and to find transitions between different states [2]. This can be described by the following formula:

$$R_{i,j} = \Theta(\epsilon - \|x_i - x_j\|), \quad \text{for } i, j = 1, 2, \dots, N, \quad (3)$$

in which  $N$  is the number of states  $x_i$ ,  $\epsilon$  is a threshold distance,  $\|\cdot\|$  a norm and  $\Theta(\cdot)$  the Heaviside function.

The most important parameter in recurrence analysis is the threshold distance. It points out that we can assume an occurrence of the recurrence point in case when the trajectory between two states is smaller than the threshold. A number of studies [42,9,21] focused on the choice of threshold distance  $\epsilon_i$ , which can be set to e.g. 10% of mean space diameter, 25% of standard deviation, 5–6% of maximal space diameter or to fixed percentage or recurrence points (basically ranged from 1.5% to 15% [43]). The above-mentioned settings are standardly used and we selected the method of fixed percentage of recurrence points  $\%RR = 2.5\%$  for this study, being one of the most frequently used method (see also [9,19]).

Graphic representation of multidimensional phase space in 2D graph (see Fig. 1), immunity to noise and nonstationarity, and recording chaotic properties without extensive data collection represent the greatest advantage of RP. Another feature of RP are recurrence points, diagonal lines as well as vertical and horizontal lines. Sequences of recurrent states are represented by diagonal lines, whereas the duration of a non-changing, or slowly changing states are reflected by vertical and horizontal lines. Rare states are represented by single isolated recurrence points [38].

Finally, structures formed by points and lines yielded by RPs comprise a basis for recurrence quantification analysis (RQA), introduced by Zbilut and Webber [44], which allow quantitative evaluation of RPs.

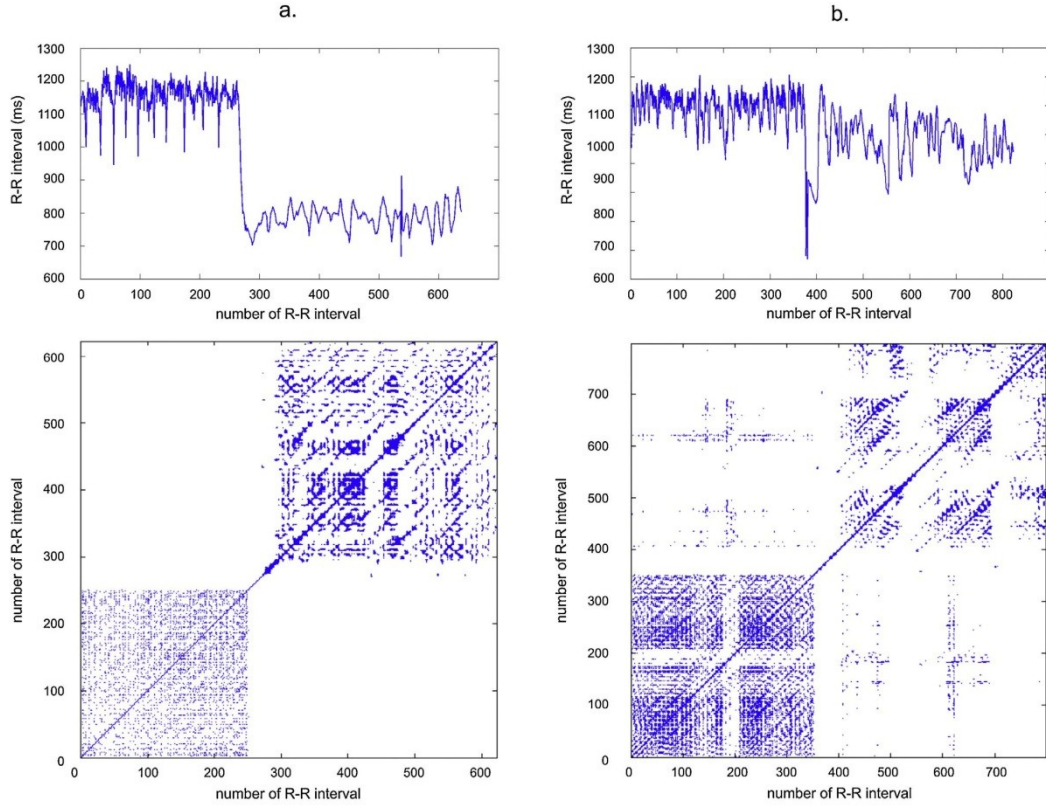
The following measures are standardly derived from RP: Percentage of recurrence points ( $RR$ ) which form RP. This measure corresponds to the probability that concrete state will recur [38]. Higher recurrence means lower system variability. However we use such a threshold distance which ensures 2.5% of recurrence points.

$$RR = \frac{1}{N^2} \sum_{i,j=1}^N R_{i,j}. \quad (4)$$

Determinism ( $DET$ ) is the percentage of recurrence points that form diagonal lines [38]. This parameter corresponds to system predictability [38]:

$$DET = \frac{\sum_{l=l_{\min}}^N lP(l)}{\sum_{i,j}^N R_{i,j}}, \quad (5)$$

in which  $P(l)$  is the histogram of the lengths of the diagonal lines ( $l$ ).



**Fig. 1.** Example of orthostatic test results in a young healthy man (a) and a young patient with syncope (b) during the orthostatic test. Upper parts of (a) and (b) depict variation of R-R intervals during the two phases of orthostatic test (first (left) part – resting in supine position, second (right) part – standing position; duration of R-R intervals on axis y and time represented in form of a sequence of R-R intervals on axis x). The lower graphs demonstrate corresponding recurrence plot in both phases of the test in each patient.

Divergence (*DIV*) is related with the Kolmogorov–Sinai entropy of the system [38]:

$$DIV = \frac{1}{L_{\max}} \quad (6)$$

Laminarity (*LAM*), percentage of points which forms vertical lines. This parameter helps to detect laminar states (states that do not change at all or that change very slowly) [38]:

$$LAM = \frac{\sum_{v=v_{\min}}^N vP(v)}{\sum_{v=1}^N vP(v)} \quad (7)$$

in which  $P(v)$  is the histogram of the lengths of the vertical lines ( $v$ ).

Ratio between *DET* and *RR* (*RATIO*), can be used to discover transitions [38]:

$$RATIO = N^2 \frac{\sum_{l=l_{\min}}^N P(l)}{\left(\sum_{l=1}^N lP(l)\right)^2} \quad (8)$$

The *DET* and *RR* ratio (*RATIO*) are used to identify hidden transitions [38].

Trapping time (*TT*), the average length of vertical lines. This parameter informs us for how long is the system trapped in a specific state [38]. It represents frequency and length of laminar

states. Low values of *LAM* and *TT* indicate high complexity of a system [9].

$$TT = \frac{\sum_{v=v_{\min}}^N vP(v)}{\sum_{v=v_{\min}}^N P(v)} \quad (9)$$

Longest diagonal line (*LMAX*) [38]:

$$L_{\max} = \max(\{l_i; i = 1, \dots, N_l\}). \quad (10)$$

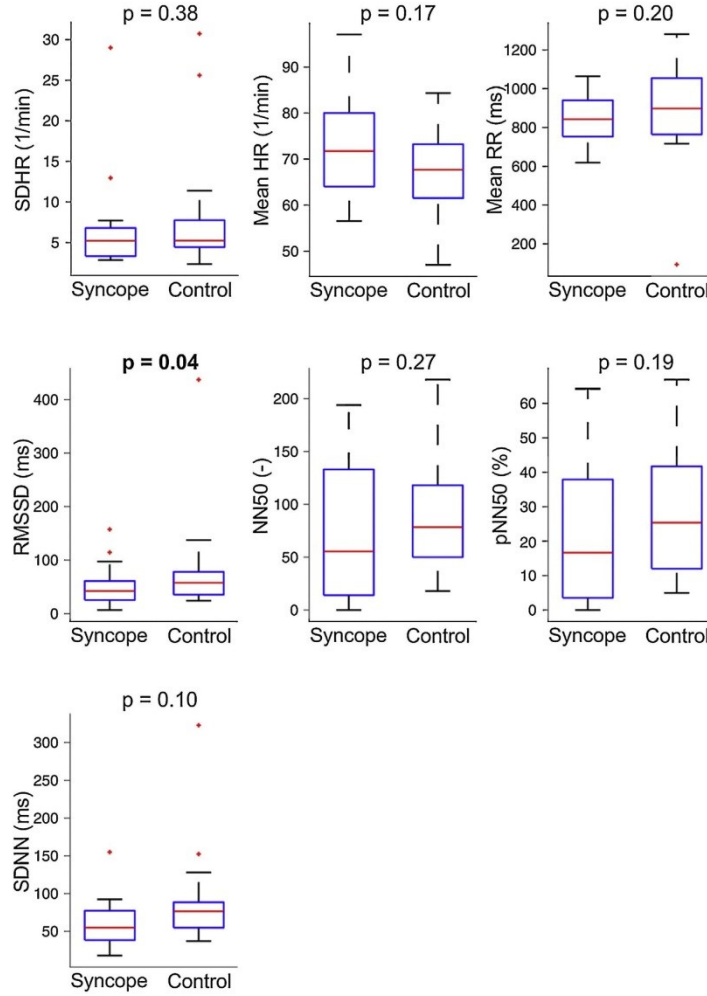
Maximum length of a diagonal line *LMAX* and its reciprocal value *DIV* might be related to the largest positive Lyapunov exponent [38].

Longest vertical line (*MAXV*) [38]:

$$MAXV = \max(\{v_i; i = 1 \dots N_v\}). \quad (11)$$

Average length of diagonal line (*AVDL*) reflects average time when there are two segments of the trajectory in phase space close to each other [38]:

$$AVDL = \frac{\sum_{l=l_{\min}}^N lP(l)}{\sum_{l=l_{\min}}^N P(l)} \quad (12)$$



**Fig. 2.** Box-plots illustrating the comparison of time domain parameters between patients with syncope and control group during laying phase of the active standing test.

Shannon entropy (*ENTR*) reflects the complexity of system dynamics [38]:

$$ENTR = - \sum_{l=l_{\min}}^N p(l) \ln p(l). \quad (13)$$

For more details with regard to RQA measures, see also [38].

### 2.3. Statistical analysis

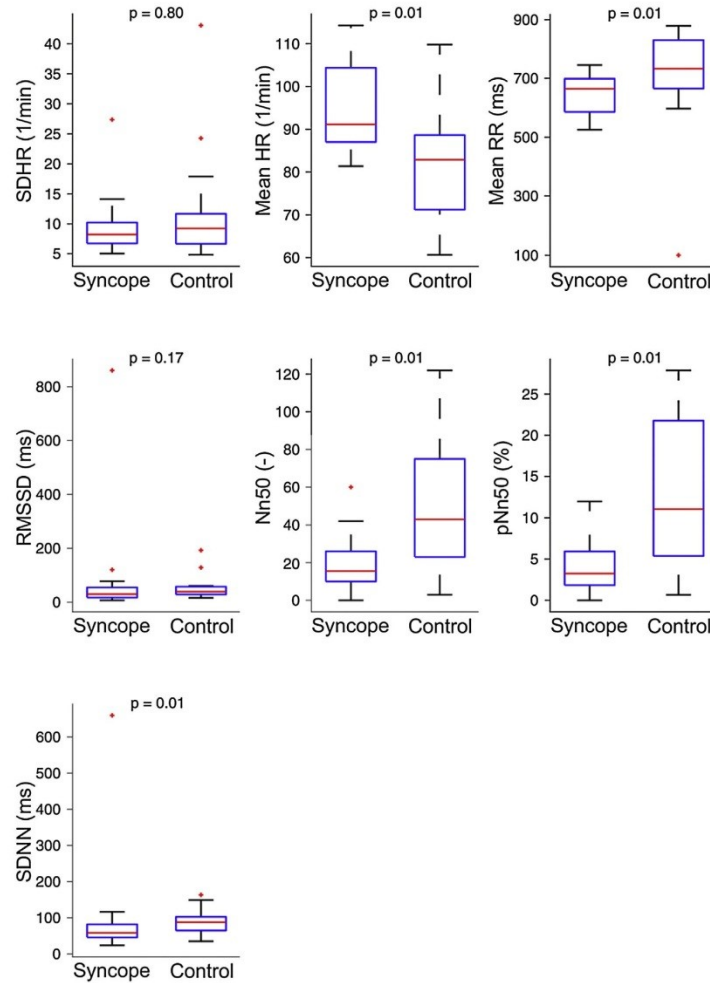
Parameters of time and frequency domain analysis and RQA measures were calculated for each subject and each phase of measurement. Kolmogorov–Smirnov test was used to verify the normality of parameters in each group. The assumption of normal data distribution in the observed participant samples was not proven in any of the cases and the normal data distribution hypothesis was rejected at significance level  $p = 0.05$ .

Therefore, non-parametric Wilcoxon test was used to compare statistical significance in the two observed groups. Testing was realized using significance level  $p = 0.05$ , and results  $p < 0.05$  were considered significant. The results and observed differences in the measured parameters between the two groups were visualized as box-plots representing median, the first and third quartile, maximum, minimum and extreme values of the obtained statistic samples. The statistical analysis was performed in MATLAB environment (MATLAB R2013a, MathWorks, Inc., Natick, MA, USA).

### 3. Results

According to an earlier study by Pietrucha et al. [45], syncopes were induced in similar proportion of women and men. Also, there was no significant relation between gender and orthostatic test results [45].





**Fig. 3.** Box-plots illustrating the comparison of time domain parameters between patients with syncope and control group during standing phase of the active standing test.

Time domain evaluation of R-R interval analysis revealed a significant drop in the values of *SDNN* ( $p=0.0111$ ), mean *HR* ( $p=0.0018$ ), *NN50* ( $p=0.0031$ ), *pNN50* ( $p=0.0042$ ) parameters, and a significant rise in the value of Mean *RR* ( $p=0.002$ ) parameter in patients with syncope during the second phase of the active standing test in contrast to the first phase where a significant difference was found only in *RMSSD* ( $p=0.0421$ ) parameter, see Figs. 2 and 3.

On the other hand, spectral analysis of R-R intervals did not identify any significant differences between the groups during the second phase of the active standing test, see Fig. 4. These two groups differed only in the significantly lower occurrence of LF ( $p=0.0032$ ) in the syncopal group in the first phase of the test (Fig. 4).

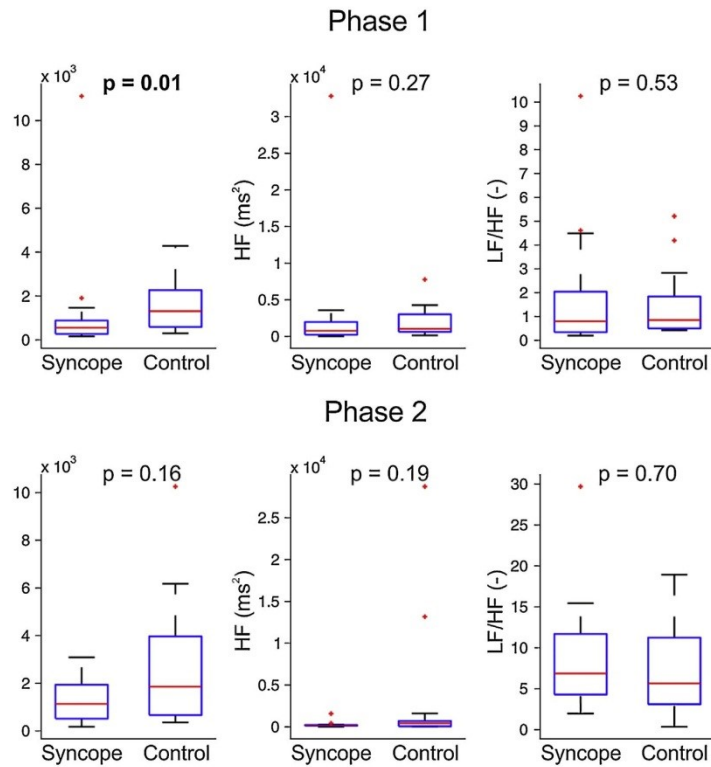
Results of recurrence analysis are depicted in Fig. 1, 5 and 6 and in Tables 2 and 3.

Fig. 1 demonstrates examples of findings in a healthy subject (Fig. 1a) with significant shortening of R-R intervals after standing-up (resting phase on the left, stand-up phase on the right of appropriate graphs in Fig. 1a and b) and with two distinctly

separated parts in the recurrence plot. On the other hand, in a syncopal patient (Fig. 1b), no clear heart rate change after stand-up was apparent and both phases of the tests overlap in the recurrence plot.

No significant change was found in RQA measures during the first phase of the orthostatic test (resting in supine position) between both groups. Wilcoxon test showed, that medians of the examined RQA measures were not significantly different (Fig. 5). Table 2 summarizes mean values of all RQA measures in the resting phase of the orthostatic test.

On the contrary, significant differences were found in most RQA measures between patients and the control group in the standing phase of the orthostatic test (Fig. 6). Significantly lower divergence (*DIV*) and significantly higher proportion of points forming diagonal lines (*DET*), length of the longest diagonal line (*LMAX*), points forming vertical lines (*LAM*), the average length of diagonal lines (*AVDL*), *RATIO*, the average length of vertical lines (*TT*) and maximal length of vertical line (*MAXV*) were found in Syncope group.



**Fig. 4.** Box-plots illustrating the comparison of frequency domain parameters between patients with syncope and control group during laying phase (Phase 1) and standing phase (Phase 2) of the active standing test.

**Table 2**

Overview results: the medians of RQA measures during first phase of active standing test.

RQA measure	Control group			Syncope group			The significance level
	25th	50th	75th	25th	50th	75th	
DET	0.1676	0.2547	0.3191	0.1676	0.2508	0.3191	0.5198
DIV	0.0852	0.0955	0.1607	0.0852	0.1181	0.1607	0.6257
LAM	0.1624	0.3508	0.4646	0.1624	0.2204	0.4646	0.2750
RATIO	6.6927	10.1700	12.7252	6.6927	10.0017	12.7252	0.5198
TT	2.0364	2.3160	2.4785	2.0364	2.1567	2.4785	0.8424
AVDL	2.2603	2.4914	2.7799	2.2603	2.3428	2.7799	0.4380
MAXV	3.0000	6.5000	7.7500	3.0000	5.0000	7.7500	0.1681
LMAX	6.2500	10.5000	11.7500	6.2500	8.5000	11.7500	0.8500
ENTR	0.5836	0.8407	0.9955	0.5836	0.7253	0.9955	0.4380

25th: 1st quartile/25th percentile; 50th: median/2nd quartile; 75th: 3rd quartile/75th percentile.

**Table 3**

Overview results: the medians of RQA measures during second phase of active standing test.

RQA measure	Control group			Syncope group			The significance level
	25th	50th	75th	25th	50th	75th	
DET	0.4178	0.5232	0.6511	0.6208	0.6743	0.7059	<b>0.0238</b>
DIV	0.0171	0.0282	0.0580	0.0102	0.0159	0.0240	<b>0.0236</b>
LAM	0.5632	0.6408	0.7412	0.7061	0.7457	0.7943	<b>0.0099</b>
RATIO	16.6148	20.9085	26.0312	24.6308	26.9236	28.1627	<b>0.0153</b>
TT	2.5700	2.7229	3.1141	2.8882	3.1127	3.3084	<b>0.0338</b>
AVDL	2.7310	2.8101	2.9780	2.8636	3.1686	3.4910	<b>0.0086</b>
MAXV	8.0000	9.0000	12.7500	10.2500	16.0000	19.5000	<b>0.0189</b>
LMAX	17.2500	35.5000	58.5000	41.7500	64.0000	99.2500	<b>0.0052</b>
ENTR	0.9889	1.0721	1.2326	1.1299	1.2952	1.3782	0.0649

25th: 1st quartile/25th percentile; 50th: median/2nd quartile; 75th: 3rd quartile/75th percentile.

Significant values (p 0.05) are in bold.

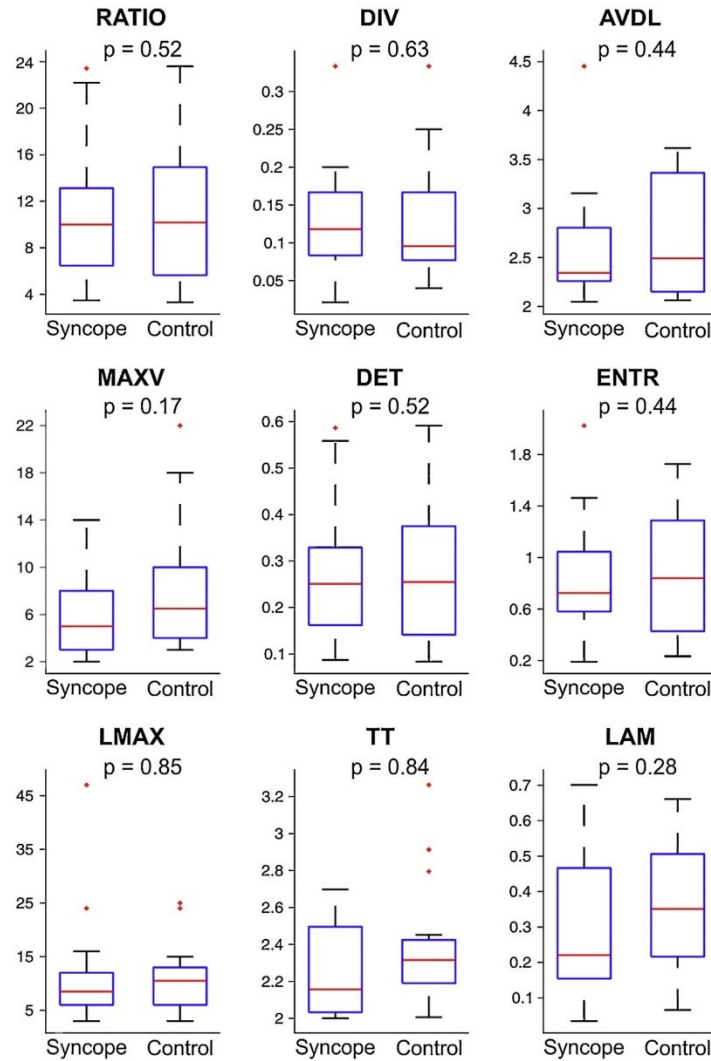


Fig. 5. Box-plots illustrating the comparison of RQA measures between patients with syncope and control group during laying phase of the active standing test.

Higher values of *DET* reflect more frequent return of the system into the previous state reflecting the system's predictability. Significant differences in *TT* and *MAXV* were also identified, see Table 3.

#### 4. Discussion

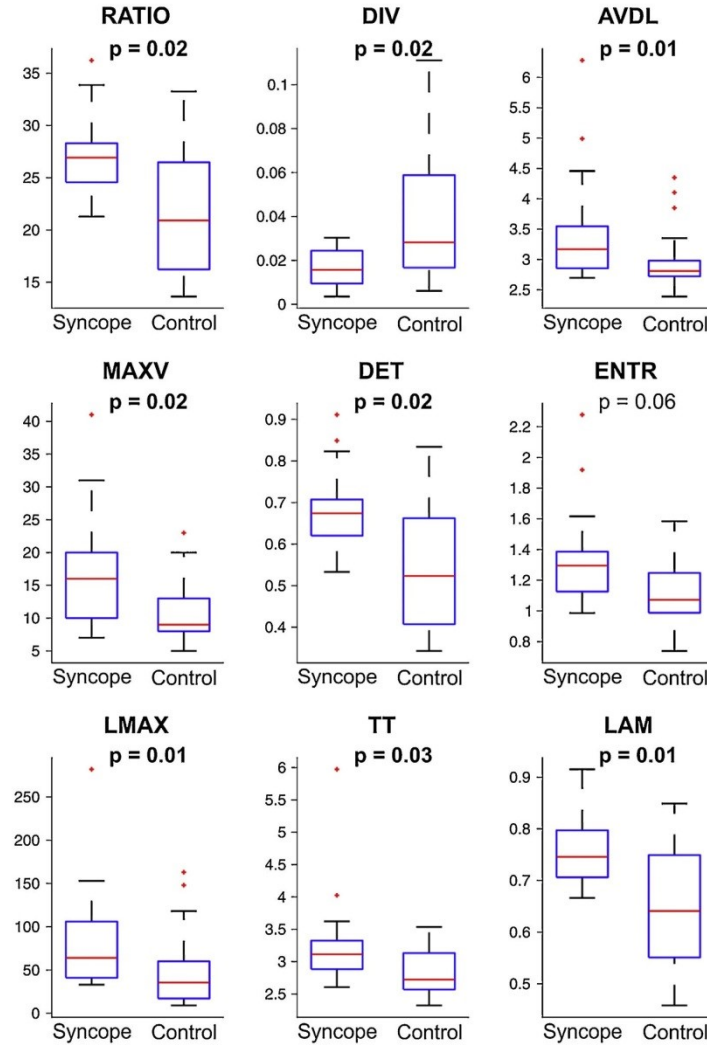
It is well known that the rigidity of sinus rhythm, i.e. a decrease in HRV is a negative prognostic marker [46,14].

The results of time domain analysis showed significant differences between the groups in the second phase of the active standing test. These findings correspond to results presented in previous studies, e.g. Lagi et al. [47] despite the fact that the analysed record was 24 h long in their study. On the other hand, results yielded by frequency domain analysis did not point to any significant

differences between the groups in any phase of the test. Based on our results, it is not possible to verify the claim [29,35] that HRV analysis is capable of identifying differences between patients and the control group, with respect to autonomic nervous system activation as a reaction to orthostasis, or of reflecting changes in the autonomic nervous system related to the onset of vasovagal episodes. In any case, the measuring protocol is partly divided in our study, with the main focus on the total test duration of 10 minutes without using tilt table. With regard to spectral analysis, it is also necessary to take into account a significant interindividual variability [31], which may significantly distort the results with errors.

This pilot study identified significant differences between results obtained from vasovagal syncope patients and healthy subjects using recurrence analysis. Our study demonstrated that the





**Fig. 6.** Box-plots illustrating the comparison of RQA measures between patients with syncope and control group during standing phase of the active standing test.

RQA measures did not differ significantly in the two groups in the first phase of the orthostatic test (resting phase). This finding was predictable, since the activity of ANS between vasovagal syncope patients and healthy population does not differ in resting position [48].

In the second phase of active standing test, expected clinical symptoms typical for syncope patients took place [48]. At the same time, changes occurred in the RQA measures. The Syncope group yielded higher *DET*, *LAM*, *MAXV*, *TT*, *AVDL*, *RATIO* and *LMAX* and lower *DIV* values reflecting lower heart rate variability, which imply pathological conditions.

Increase in *DET* values generally points out to a more frequent return of the system (sinus rhythm) to previous states [49] and at the same time, increase in *LAM* values reflects higher rate of laminar phases in the system [49], and thus an increased intermittence.

An increase in *MAXV* value in patients with syncopes points out to the fact that sinus rhythm remains in its previous phase longer [49]. Additional data to *MAXV* is *TT*, which represents the time span of a specific state in the system [49]. Higher values of *AVDL* levels in patients with syncope also reflect lower variability. An average length of an *AVDL* diagonal line represents a state when the trajectory in the phase space runs directly into another segment of the phase space, also called mean prediction time [38].

The significant differences observed between these parameters in healthy subjects and in patients with syncopes after verticalization reflect lower HRV. This means that increase in the parameters implies a higher predictability of the system [50].

The aforementioned observation is caused by the fact that physiological circumstances activate the regulatory function of ANS in terms of the adaptation to the given situation either by increased

activity of sympathetic or parasympathetic, to preserve balanced system and to avoid the occurrence of pathological states. These changes in the activation of the two parts of ANS at the same time cause significant deviations in heart rate. However, in the case of syncope, with disorders in regulatory function of ANS (decreased activity of sympathetic), these mechanisms cannot take place, and thus apparent influence of ANS on heart activity in terms of heart beat variability are not as significant.

## 5. Conclusions

In our study, recurrence analysis was applied for evaluation of HRV with the aim to identify ANS dysfunction that is responsible for orthostatic syncope in patients. Results from recurrence analysis were compared with the standard HRV analysis that is based on time-domain and frequency domain analysis. Our results suggest that recurrence analysis may be useful tool for identifying patients with autonomic dysfunction that present with orthostatic syncope and that this method may be more sensitive in detecting ANS dysfunction than the measures of HRV derived from time and frequency domain analysis. Since these standard methods of HRV analysis have been demonstrated to be useful in the assessment and identification of high-risk patients with cardiovascular diseases connected to heart attack [15,16,46] or diabetic neuropathy [27,28], recurrence analysis with its possibly higher sensitivity to detect ANS dysfunction may help in the risk-stratification of these patients in the future.

However, since recurrence analysis represents a new method, some questions related to optimal set of input parameters (especially the threshold distance) remain open and widely discussed [42,43]. Moreover, this study represents a pilot project and the demonstrated findings should be perceived in this light, as a relatively small number of subjects in both groups and the lack of gender-matched control group pose certain limitations. Therefore, future studies in this area would be appreciated.

## Acknowledgement

This work was supported by the Grant Agency of the Czech Technical University in Prague, grant no. SGS14/169/OHK4/2T/17 and grant no. SGS14/170/OHK4/2T/17. The authors would also like to thank Andrej Madoran, BA, for the translation of this paper.

## References

- [1] N. Marwan, M. Carmenromano, M. Thiel, J. Kurths, Recurrence plots for the analysis of complex systems, *Phys. Rep.* 438 (5–6) (2007) 237–329, <http://dx.doi.org/10.1016/j.physrep.2006.11.001>.
- [2] M. Trauth, E. Sillmann, MATLAB and Design Recipes for Earth Sciences: How to Collect, Process and Present Geoscientific Information, Springer Publishing Company, Incorporated, 2012.
- [3] D. Petkovic, Z. Cobjasic, Adaptive neuro-fuzzy estimation of autonomic nervous system parameters effect on heart rate variability, *Neural Comput. Appl.* 21 (8) (2012) 2065–2070, <http://dx.doi.org/10.1007/s00521-011-0629-z>.
- [4] V. Sharma, Deterministic chaos and fractal complexity in the dynamics of cardiovascular behavior: perspectives on a new frontier, *Open Cardiovasc. Med. J.* 3 (2009) 110–123.
- [5] R. Silipo, G. Deco, R. Vergassola, H. Bartsch, Dynamics extraction in multivariate biomedical time series, *Biol. Cybern.* 79 (1) (1998) 15–27.
- [6] K.J. Quan, M.D. Carlson, M.D. Thames, Mechanisms of heart rate and arterial blood pressure control: implications for the pathophysiology of neurocardiogenic syncope, *Pacing Clin. Electrophysiol.* 20 (3 Pt 2) (1997) 764–774.
- [7] D.G. Benditt, D.W. Ferguson, B.P. Grubb, W.N. Kapoor, J. Kugler, B.B. Lerman, J.D. Maloney, A. Raviele, B. Ross, R. Sutton, M.J. Wolk, D.L. Wood, Tilt table testing for assessing syncope, *J. Am. Coll. Cardiol.* 28 (1) (1996) 263–275.
- [8] A.L. Mark, The Bezold–Jarisch reflex revisited: clinical implications of inhibitory reflexes originating in the heart, *J. Am. Coll. Cardiol.* 1 (1) (1983) 90–102.
- [9] M. Javorka, Z. Trunkvalterova, I. Tonhajzerova, Z. Lazarova, J. Javorkova, K. Javorka, Recurrences in heart rate dynamics are changed in patients with diabetes mellitus, *Clin. Physiol. Funct. Imaging* 28 (5) (2008) 326–331.
- [10] M.A. Riley, R. Balasubramaniam, M.T. Turvey, Recurrence quantification analysis of postural fluctuations, *Gait Posture* 9 (1) (1999) 65–78.
- [11] F. Lombardi, Heart rate variability: a contribution to a better understanding of the clinical role of heart rate, *Eur. Heart J.* 1 (Suppl. H) (1999) H44–H51.
- [12] A. Moya, R. Sutton, F. Ammirati, J.J. Blanc, M. Brignole, J.B. Dahm, J.C. Deharo, J. Gajek, K. Gjesdal, A. Krahn, M. Massin, M. Pepi, T. Pezawas, R. Ruiz Granell, F. Sarasin, A. Ungar, J.G. van Dijk, E.P. Walma, W. Wieling, H. Abe, D.G. Benditt, W.W. Decker, B.P. Grubb, H. Kaufmann, C. Morillo, B. Olshansky, S.W. Parry, R. Sheldon, W.K. Shen, A. Vahanian, A. Auricchio, J. Bax, C. Ceconi, V. Dean, G. Filippatos, C. Funck-Brentano, R. Hobbs, P. Kearney, T. McDonagh, K. McGregor, B.A. Popescu, Z. Reiner, U. Sechtem, P.A. Simes, M. Tendra, P. Vardas, P. Widimsky, A. Auricchio, E. Acarturk, F. Andreotti, R. Asteggiano, U. Bauersfeld, A. Bellou, A. Benetos, J. Brandt, M.K. Chung, P. Cortelli, A. Da Costa, F. Extramiana, J. Ferro, B. Gorenek, A. Hedman, R. Hirsch, G. Kaliska, R.A. Kenny, K.P. Kjeldsen, R. Lampert, H. Molgare, R. Paju, A. Puodziukynas, A. Raviele, P. Roman, M. Scherer, R. Schondorf, R. Sicari, P. Vanbrabant, C. Wolpert, J.L. Zamorano, Guidelines for the diagnosis and management of syncope (version 2009), *Eur. Heart J.* 30 (21) (2009) 2631–2671.
- [13] R. Sutton, D.M. Bloomfield, Indications, methodology, and classification of results of tilt-table testing, *Am. J. Cardiol.* 84 (8A) (1999) 10Q–19Q.
- [14] No authors listed, Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use, Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology, *Circulation* 93 (5) (1996) 1043–1065.
- [15] M.T. La Rovere, G. Specchia, A. Mortara, P.J. Schwartz, Baroreflex sensitivity, clinical correlates, and cardiovascular mortality among patients with a first myocardial infarction. A prospective study, *Circulation* 78 (4) (1988) 816–824.
- [16] M.T. La Rovere, G.D. Pinna, R. Maestri, A. Mortara, S. Capomolla, O. Febo, R. Ferrari, M. Franchini, M. Gnemmi, C. Opasich, P.G. Riccardi, E. Traversi, F. Cobelli, Short-term heart rate variability strongly predicts sudden cardiac death in chronic heart failure patients, *Circulation* 107 (4) (2003) 565–570.
- [17] R.E. Kleiger, J.T. Bigger, M.S. Bosner, M.K. Chung, J.R. Cook, L.M. Rolnitzky, R. Steinman, J.L. Fleiss, Stability over time of variables measuring heart rate variability in normal subjects, *Am. J. Cardiol.* 68 (6) (1991) 626–630.
- [18] G. Sannino, P. Mellillo, G. De Pietro, S. Stranges, L. Pecchia, To what extent it is possible to predict falls due to standing hypotension by using hr and wearable devices? study design and preliminary results from a proof-of-concept study, in: L. Pecchia, L. Chen, C. Nugent, J. Bravo (Eds.), *Ambient Assisted Living and Daily Activities*, Vol. 8868 of Lecture Notes in Computer Science, Springer International Publishing, 2014, pp. 167–170.
- [19] T. Nedelka, J. Schlenker, L. Riedelbauchova, R. Mazanec, Recurrence quantification analysis of heart rate variability in early diagnosis of diabetic autonomic neuropathy, *Cesk. Slov. Neurol.* N. 75 (6) (2012) 721–728 (in Czech).
- [20] M. Mohebbi, H. Ghassemani, Prediction of paroxysmal atrial fibrillation using recurrence plot-based features of the RR-interval signal, *Physiol. Meas.* 32 (8) (2011) 1147–1162.
- [21] U.R. Acharya, S.V. Sree, S. Chattopadhyay, W. Yu, P.C. Ang, Application of recurrence quantification analysis for the automated identification of epileptic EEG signals, *Int. J. Neural Syst.* 21 (3) (2011) 199–211.
- [22] J.E. Naschitz, I. Rosner, M. Rozenbaum, M. Fields, H. Isseroff, J.P. Babich, E. Zuckerman, N. Elias, D. Yeshurun, S. Naschitz, E. Sabo, Patterns of cardiovascular reactivity in disease diagnosis, *QJM* 97 (3) (2004) 141–151.
- [23] J. Schlenker, T. Nedelka, Recurrence Analysis in Patients with Vasovagal Syncope, in: *Measurement 2013–9th International Conference on Measurement (Proceedings)*, Vol. 4 of 5, Institute of Measurement Science, SAS, Slovakia, 2013, pp. 145–148.
- [24] G.D. Pinna, R. Maestri, A. Torunski, L. Danilowicz-Szymanowicz, M. Szwoch, M.T. La Rovere, G. Raczak, Heart rate variability measures: a fresh look at reliability, *Clin. Sci.* 113 (3) (2007) 131–140.
- [25] R. Maestri, G. Raczak, L. Danilowicz-Szymanowicz, A. Torunski, A. Sukienik, J. Kubica, M.T. La Rovere, G.D. Pinna, Reliability of heart rate variability measurements in patients with a history of myocardial infarction, *Clin. Sci.* 118 (3) (2010) 195–201.
- [26] S. Haegele-Link, D. Claus, S. Ducker, T. Vogt, F. Birklein, Evaluation of the autonomic nervous system using the FAN device – range of normal and examples of abnormal, *Open Neurol. J.* 2 (2008) 12–19.
- [27] D. Ziegler, K. Dannehl, H. Muhlen, M. Spuler, F.A. Gries, Prevalence of cardiovascular autonomic dysfunction assessed by spectral analysis, vector analysis, and standard tests of heart rate variation and blood pressure responses at various stages of diabetic neuropathy, *Diabet. Med.* 9 (9) (1992) 806–814.
- [28] H.H. Kramer, R. Rolke, M. Hecht, A. Bickel, F. Birklein, Follow-up of advanced diabetic neuropathy: useful variables and possible pitfalls, *J. Neurol.* 252 (3) (2005) 315–320.
- [29] G.E. Kochiadakis, E.M. Kanoupakis, N.E. Igoumenidis, M.E. Marketou, M.C. Solomon, P.E. Vardas, Spectral analysis of heart rate variability during tilt-table testing in patients with vasovagal syncope, *Int. J. Cardiol.* 64 (2) (1998) 185–194.
- [30] J.P. Niskanen, M.P. Tarvainen, P.O. Ranta-Aho, P.A. Karjalainen, Software for advanced HRV analysis, *Comput. Methods Programs Biomed.* 76 (1) (2004) 73–81.
- [31] E. Vickova, J. Bednarik, S. Bursov, K. Sajgalikov, L. Mlacikova, Spectral analysis of heart rate variability – normative data, *Ceska. Slovenska Neurol. Neurochir.* 73 (6) (2010) 663–672 (in Czech).
- [32] V. Socha, J. Schlenker, P. Kalavsky, P. Kutilek, L. Socha, S. Szabo, P. Smrcka, Effect of the change of flight, navigation and motor data visualization on psychophysiological state of pilots, in: *13th International Symposium on Applied Machine Intelligence and Informatics*, 2015, pp. 339–344.
- [33] M. Regula, V. Socha, P. Kutilek, L. Socha, K. Hana, L. Hanakova, S. Szabo, Effect of the change of flight, navigation and motor data visualization on



- psychophysiological state of pilots, in: 16th International Conference on Mechatronics, 2014, pp. 639–643.
- [34] G. Piccirillo, C. Naso, A. Moise, M. Lionetti, M. Nocco, S. Di Carlo, T. De Laurentis, D. Magri, M. Cacciafesta, V. Marigliano, Heart rate and blood pressure variability in subjects with vasovagal syncope, *Clin. Sci.* 107 (1) (2004) 55–61.
  - [35] G. Kochiadakis, P. Lees, E. Kanoupakis, N. Igoumenidis, E. Manios, P. Vardas, Spectral analysis of heart rate variability in the analysis of autonomic nervous system activity during tilt-table testing in patients with unexplained syncope, in: *Computers in Cardiology* 1997, 1997, pp. 367–369, <http://dx.doi.org/10.1109/CIC.1997.647909>.
  - [36] J. Koderá, V. Tran, Visual recurrence analysis and its application on the Czech Stock Market, *Polit. Ekonomie* 57 (3) (2009) 305–322 (in Czech).
  - [37] N. Marwan, N. Wessel, U. Meyerfeldt, A. Schirdewan, J. Kurths, Recurrence plot based measures of complexity and its application to heart rate variability data, *Phys. Rev. E* 66 (2) (2002) 026702.
  - [38] N. Marwan, Encounters with neighbours: current developments of concepts based on recurrence plots and their applications (Ph.D. thesis), 2003.
  - [39] A.M. Fraser, H.L. Swinney, Independent coordinates for strange attractors from mutual information, *Phys. Rev. A* 33 (2) (1986) 1134–1140.
  - [40] L. Cao, Practical method for determining the minimum embedding dimension of a scalar time series, *Phys. D* 110 (1–2) (1997) 43–50, [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-2789\(97\)00118-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-2789(97)00118-8).
  - [41] J. Schlenker, T. Nedelka, L. Riedlbauchova, V. Socha, K. Hana, P. Kutilek, Recurrence quantification analysis: a promising method for data evaluation in medicine, *Eur. J. Biomed. Inform.* 10 (1) (2014) 35–40.
  - [42] S. Schinkel, O. Dimigen, N. Marwan, Selection of recurrence threshold for signal detection, *Eur. Phys. J. Special Top.* 164 (1) (2008) 45–53, <http://dx.doi.org/10.1140/epjst/e2008-00833-5>.
  - [43] H. Ding, S. Crozier, S. Wilson, Optimization of Euclidean distance threshold in the application of recurrence quantification analysis to heart rate variability studies, *Chaos Solitons Fractals* 38 (5) (2008) 1457–1467.
  - [44] N. Marwan, A historical review of recurrence plots, *Eur. Phys. J. Special Top.* 164 (1) (2008) 3–12, <http://dx.doi.org/10.1140/epjst/e2008-00829-1>.
  - [45] A. Pietrucha, E. Wojewodka-Zak, M. Wnuk, M. Węgrzynowska, I. Bzukała, J. Nessler, D. Mroczek-Czernecka, W. Piwowarska, The effects of gender and test protocol on the results of head-up tilt test in patients with vasovagal syncope, *Kardiol. Pol.* 67 (8A) (2009) 1029–1034.
  - [46] J. Kautzner, M. Malik, Heart rate variability and its clinical utility. Part 1, *Cor. Vasa.* 4 (40) (1998) 182–187 (in Czech).
  - [47] A. Lagi, C. Tamburini, M. Cipriani, L. Fattorini, Vagal control of heart rate variability in vasovagal syncope: studies based on 24-h electrocardiogram recordings, *Clin. Auton. Res.* 7 (3) (1997) 127–130.
  - [48] C. Forleo, P. Guida, M. Iacoviello, M. Resta, F. Monitillo, S. Sorrentino, S. Favale, Head-up tilt testing for diagnosing vasovagal syncope: a meta-analysis, *Int. J. Cardiol.* 168 (1) (2013) 27–35.
  - [49] M. Javorka, Z. Turianikova, I. Tonhajzerova, K. Javorka, M. Baumert, The effect of orthostasis on recurrence quantification analysis of heart rate and blood pressure dynamics, *Physiol. Meas.* 30 (1) (2009) 29–41.
  - [50] S. Schinkel, N. Marwan, O. Dimigen, J. Kurths, Confidence bounds of recurrence-based complexity measures, *Phys. Lett. A* 373 (2009) 2245–2250.

## Relationship Between Cardiac Autonomic Neuropathy and Atherosclerosis in Patients with Diabetes Mellitus



Sarka Mala<sup>1\*</sup>, Lucie Hoskovcova<sup>1</sup>, Lucie Riedlbauchova<sup>2</sup>, Tomas Nedelka<sup>3</sup> and Jan Broz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Internal Medicine Department, University Hospital Motol, Czech Republic

<sup>2</sup>Department of Cardiology, University Hospital Motol, Czech Republic

<sup>3</sup>Department of Neurology, University Hospital Motol, Czech Republic

**Submission:** September 28, 2018; **Published:** October 10, 2018

\*Corresponding author: Sarka Mala, Internal Medicine Department, University Hospital Motol, V Uvalu 84, 15006, Prague, Czech Republic, Email-sarkamal@seznam.cz

### Abstract

Cardiovascular disease is the major cause of death in diabetic patients. Diabetes mellitus patients have a 4-fold-higher risk of having a cardiovascular event than people without diabetes. Cardiac autonomic neuropathy is a frequent and severe complication of diabetes mellitus. Definite cardiac autonomic neuropathy is present in one fifth of diabetic patients. Cardiac autonomic neuropathy diagnosis is associated with a 5-fold increase in mortality, higher prevalence of silent myocardial ischemia as well as systolic and diastolic left ventricular dysfunction. In the last several years many works described a significant relationship between cardiac autonomic neuropathy and atherosclerotic vascular disease in type 1 and type 2 diabetes mellitus population. Our review focuses on possible pathophysiological pathways binding these two important diabetic complications.

**Keywords:** Autonomic neuropathy; Diabetes mellitus; Atherosclerosis; Arterial stiffness

### Introduction

Patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus have significantly higher risk of cardiovascular disease including coronary artery disease (CAD), stroke, and peripheral arterial disease comparing to non-diabetic population [1-3]. Cardiovascular disease is the major cause of death in diabetic patients (approximately 70%) [4,5]. Type 2 diabetes mellitus patients have a 4-fold-higher risk of having a cardiovascular event than people without diabetes after adjusting to common risk factors of atherosclerosis, such as age, tobacco smoking, obesity, hyperlipidemia and hypertension. Major cardiovascular event (such as myocardial infarction, coronary revascularization, stroke, acute coronary heart disease death) is 3 times more often in type 1 diabetic men and up to 7 times more often in type 1 diabetic women [5,6].

Prolonged hyperglycemia is considered to be a main cause of diabetic microvascular and macrovascular complications [4,7,8]. Chronic hyperglycemia induces the production of advanced glycation end products (AGEs) through the non-enzymatic glycation process, alters intracellular signaling cascades (protein kinase C activation), and increases oxidative stress. All these mechanisms interact and lead to many structural and functional changes of the vascular wall inducing the atherosclerosis development [9]. Hy

perglycemia also increases platelet aggregation, risk of thrombus formation and atherosclerosis progression [10].

In patients with type 2 diabetes mellitus, obesity and fatty tissue accumulation lead to lipid metabolism changes and pro-inflammatory markers production. In these subjects, insulin resistance is critically involved in vascular dysfunction [11,12]. Cardiac autonomic neuropathy (CAN) is a frequent and severe complication of diabetes mellitus. Definite CAN is present in one fifth of diabetic patients [13]. CAN diagnosis is associated with a 5-fold increase in mortality comparing to diabetic patients without CAN, and a higher prevalence of silent myocardial ischemia as well as systolic and diastolic left ventricular dysfunction [14-16]. CAN incidence correlates to QT prolongation and increase the risk of malignant arrhythmias and sudden cardiac death [17]. In the last several years many works described a significant relationship between cardiac autonomic neuropathy and atherosclerotic vascular disease in type 1 and type 2 diabetes mellitus population [18-24].

Are cardiac autonomic neuropathy together with accelerated atherosclerosis only products of prolonged unsatisfactory metabolic compensation or is there a pathophysiological mechanism

that promotes atherosclerosis development in patients suffering CAN? We would like to address these questions in our review.

#### Risk factors of CAN and atherosclerosis

Age, diabetes mellitus, high cholesterol and low density lipoprotein levels, low level of high density lipoprotein, hypertension, tobacco smoke, obesity and inactive lifestyle are now considered to be major risk factors of atherosclerosis [25].

Some of these factors were also found to be risk markers of CAN. A meta-analysis of Dafaalla et al. from 2016 found that age, duration of diabetes, glycated hemoglobin level, BMI, serum triglycerides, hypertension and incidence of microvascular complications are directly related to the risk of CAN development in type 1 diabetes mellitus [26]. Similar findings applies for CAN in type 2 diabetes mellitus. Reduced heart rate variability (an indicator of CAN) in type 2 diabetes mellitus patients is also in association with obesity and smoking [16]. Poor glycemic control seems to be a major risk for CAN progression in diabetic patient [27-29]. Many risk factors of atherosclerosis and diabetic CAN overlap, especially in type 2 diabetes mellitus patients. But what is the exact mechanism of CAN development? Is it only a result of vasa nervorum ischemia or do also other pathogenic pathways take a part?

#### Pathogenesis of CAN

Pathogenesis of CAN is complex, multifactorial and not entirely clear. Multiple ethiological hypotheses were proposed including hyperglycemia induced nerve fibers injury, autoimmune damage and neurohormonal growth factor deficiency [15,29,30].

#### Hyperglycemia

Long term hyperglycemia is considered to be a leading cause of micro and macrovascular complications of diabetes mellitus. Hyperglycemia leads through the alteration of many metabolic pathways to endothelial dysfunction, decreased neuronal blood flow and nerve fiber damage. Excess of glucose activates the polyol pathway leading to sorbitol accumulation. NADPH is consumed as a coenzyme in this process. Relative deficiency of NADPH may cause impaired NO synthesis and decreased nerve blood flow [15,31]. Hyperglycemia induced metabolic changes result in increased free radicals production and oxidative stress that lead to vascular endothelium damage [15]. Accelerated advanced glycation end (AGE) products formation alters the membrane permeability as well as neuronal and endothelial function [32]. Increased formation of diacylglycerol lead to the subsequent activation of protein kinase C (PKC). PKC pathway affects the regulation of endothelial permeability, vasoconstriction, extracellular matrix synthesis, abnormal angiogenesis and cytokine activation [33]. All these mechanisms result in functional and structural changes of vessels (including vasa nervorum) and nerve fibers.

#### Autoimmunity

The role of autoimmunity on diabetic autonomic neuropathy is also discussed. Several studies proved the independent association of nervous tissue antibodies and CAN presence in patients with

T1DM [15,29,34-36]. One of the most recent prospective study with adolescent T1DM patients was published in 2014. Zanone et al. has followed 66 patients for 16 years. 19 of them had circulating antibodies (Ab) to autonomic tissues. Prevalence of abnormal cardiovascular autonomic tests and autonomic symptoms were higher in Ab-positive (68 and 26%) than Ab-negative (32 and 4%) patients ( $P < 0.05$ ) independent of glycemic control [37]. Study of Shigeta et al. found that the presence of circulating sulfatide and phospholipid antibodies correlates with diabetic neuropathy in 68 T2DM patients [38,39]. However more studies are needed to prove the role of autoimmunity on diabetic autonomic neuropathy in T2DM patients.

#### Genetic predisposition

Many genes were found to have an association with the development or progression of diabetic neuropathy (i.e. ACE, MTHFR, GST, GLO1, APOE, TCF7L2, VEGF, IL-4, GPX1, eNOS, ADRA2B, GFRA2, MIR146A, MIR128A) [40]. Some of the studies were focused to find gene polymorphisms correlation with diabetic autonomic neuropathy. Genes associated with autonomic dysfunction code for example an antioxidant enzyme (Glutathione S-transferase), transcription factor (TCF7L2 gene) or autonomic nervous system receptor (alpha2B-adrenergic receptor) [40-42].

#### Possible pathogenic pathways binding CAN and atherosclerosis progression

It seems that autonomic neuropathy is not only a microvascular complication, but several pathophysiological mechanisms are involved in its development. Let's have a look from the other side. How could CAN contribute to atherosclerosis development and progression?

#### Non-dipping and Hypertension

The autonomic nervous system is responsible for the optimal regulation of the heart rate, strength of cardiac muscle contraction and vessel tone. The renin-angiotensin-aldosterone system controls the body fluid volume. Both of these systems interact and regulate the blood pressure. Blood pressure, along with the heart rate, physiologically decreases during the sleep period as a result of the higher tone of the parasympathetic nervous system. This phenomenon is called nocturnal dipping and it is at least 10% drop of blood pressure in comparison to average daily values. It is known that nerve fiber loss is length-dependent. That explains predominant parasympathetic (vagus nerve) impairment in early stages of CAN [31]. Vagal nerve dysfunction and relative hyperactivity of the sympathetic nervous system in early stages of CAN is the most probable cause of insufficient drop of blood pressure during the sleep (so called blood pressure „nondipping“) or even rise of blood pressure during the night (so called „reverse dipping“) [27,43,44].

Nondipping and reverse dipping is associated with left ventricular hypertrophy and cardiovascular events [45-48]. A meta-analysis of Cuspidi et al. proved the association between nondipping and increased risk of subclinical atherosclerosis [49]. Moreover a prospective study which monitored 75 adolescent



T1DM patients found that the abnormal blood pressure pattern during the night period also precedes the development of microalbuminuria (marker of glomerular and vascular dysfunction) [50]. All these studies support a statement of Vinik and his colleagues from 2003 who suggested that an impaired circadian pattern of sympathovagal activity with higher blood pressure values during the night and subsequent complications could represent an important link between CAN and an increased risk of mortality in diabetic patients [15].

### Arterial stiffness

There are also data indicating that CAN is associated with arterial stiffness [51-53]. Arterial stiffness leads to higher arterial wall resistance and increases systolic blood pressure. Higher systolic blood pressure promotes atherosclerosis development. Again we are confronted with the question whether CAN and arterial stiffness are common results of chronic bad diabetic compensation or whether they interact. As we discussed above, early stages of CAN are accompanied by prevalent parasympathetic impairment leading to relative hyperactivity of sympathetic nervous system. Higher sympathetic tone leads to tachycardia in rest. In rat animal models, an artificial increase of heart rate determines the reduction of arterial distensibility [54-56]. Moreover, vagal denervation is associated with higher procollagen mRNA levels in the wall of affected vessels [57]. Sympathetic denervation may cause dedifferentiation of vascular smooth muscle cells and intima thickening [58]. These findings suggest that the autonomic nervous system alterations have a

negative trophic effect on arterial wall and could lead to increased arterial stiffness. This hypothesis seems to be supported by a prospective study of Prince et al. published in 2010. It showed that CAN (expressed as decreased heart rate variability in deep breathing test) is associated with increased arterial stiffness 18 years later in type 1 diabetes mellitus patients [59].

### Inflammatory pathway

Experimental studies showed that the autonomic nervous system modulates the systemic inflammatory response through the cholinergic anti-inflammatory pathway [60,61]. Rodrigues et al. [19] who published in 2010 an interesting study that proved that reduced heart rate variability (marker of CAN) predicts the progression of coronary artery calcification in adults with and without T1DM, suggested that autonomic neuropathy leading to pro-inflammatory state could represent one pathway leading to atherosclerosis progression [19]. A study from 2017 found an association of lower heart rate variability (HRV) and white blood cells count (WBC), this study also described an inverse association of inflammatory markers (WBC and CRP) with baroreflex sensitivity and carotid plaque area [62]. Another study described an association of lower HRV parameters, presence of depression and higher IMT with CRP and IL6 [63]. Nevertheless more studies are needed to confirm how could autonomic dysfunction activate the inflammatory system and promote atherosclerosis.

All mentioned pathophysiological pathways binding CAN and atherosclerosis are summarized on simplified schema (Figure 1).

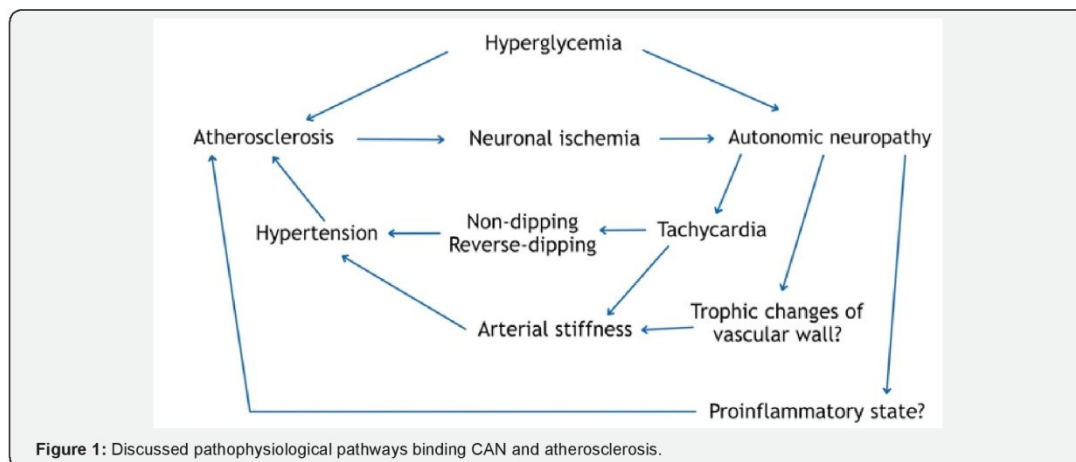


Figure 1: Discussed pathophysiological pathways binding CAN and atherosclerosis.

### Discussion

Our review focused on the relationship between CAN and atherosclerosis development in diabetic patients. Although some risk factors of atherosclerosis overlap with the risk factors of CAN, it seems that the pathophysiology of CAN is more complex and multifactorial. Several small studies found a significant correlation between the presence of circulating autonomic tissue antibodies and diabetic autonomic neuropathy. The role of

genetic polymorphisms and epigenetic changes of several genes associated with autonomic function is also discussed.

It seems that both of these diabetic complications interact and mutually affect the progression of each other. We discussed the possible pathways (heart rate and blood pressure increase, trophic changes of arterial wall, arterial stiffness, pro-inflammatory state) through which CAN may contribute to atherosclerosis progression. Future prospective studies on young diabetic patients with

good glycemic control and free of macrovascular complications could help to identify the exact pathophysiological mechanisms between these two units and hopefully find a way how to decrease cardiovascular mortality in diabetic patients.

## References

- American Diabetes association (1989) Consensus Statement: Role of cardiovascular risk factors in prevention and treatment of macrovascular disease in diabetes. *Diabetes Care* 12(8): 573-579.
- Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D (1993) Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* 16(2): 434-444.
- Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA, Kelley JL, Cayatte AJ, et al. (1992) Pathogenesis of the atherosclerotic lesion. Implications for diabetes mellitus. *Diabetes Care* 15(9): 1156-1167.
- Laakso M (1999) Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetes* 48(5): 937-942.
- de Ferranti SD, de Boer IH, Fonseca V, Fox CS, Golden SH, et al. (2014) Type 1 diabetes mellitus and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. *Diabetes Care* 130(13):1110-1130.
- Buyken AE, von Eckardstein A, Schulte H, Cullen P, Assmann G (2007) Type 2 diabetes mellitus and risk of coronary heart disease: results of the 10-year follow-up of the PROCAM study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 14(2): 230-236.
- Grundy SM, Benjamin IJ, Burke GL, Chait A, Eckel RH, et al. (1997) Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* 100(10): 1134-1146.
- Diabetes Control and Complications Trial Research Group, Nathan DM, Genuth S, Lachin J, Cleary P, et al. (1993) The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329(14): 977-986.
- Aronson D, Rayfield EJ (2002) How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms. *Cardiovasc Diabetol* 1: 1.
- Grant PJ (2007) Diabetes mellitus as a prothrombotic condition. *J Intern Med* 262(2): 157-172.
- Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ (2006) Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation* 113(15): 1888-1904.
- Paneni F, Beckman JA, Creager MA, Cosentino F (2013) Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Eur Heart J* 34(31): 2436-2443.
- Spallone V, Ziegler D, Freeman R, Bernardi L, Frontoni S, et al. (2011) Cardiovascular autonomic neuropathy in diabetes: clinical impact, assessment, diagnosis, and management. *Diabetes Metab Res Rev* 27(7): 639-653.
- Maser RE, Mitchell BD, Vinik AI, Freeman R (2003) The association between cardiovascular autonomic neuropathy and mortality in individuals with diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care* 26(6): 1895-1901.
- Vinik AI, Maser RE, Mitchell BD, Freeman R (2003) Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care* 26(5): 1553-1579.
- Vinik AI, Ziegler D (2007) Diabetic cardiovascular autonomic neuropathy. *Circulation* 115(3): 387-397.
- Ewing DJ, Boland O, Neilson JM, Cho CG, Clarke BF (1991) Autonomic neuropathy, QT interval lengthening, and unexpected deaths in male diabetic patients. *Diabetologia* 34(3): 182-185.
- Meyer C, Milat F, McGrath BP, Cameron J, Kotsopoulos D, et al. (2004) Vascular dysfunction and autonomic neuropathy in Type 2 diabetes. *Diabet Med* 21(7): 746-751.
- Rodrigues TC, Ehrlich J, Hunter CM, Kinney GL, Rewers M, et al. (2010) Reduced heart rate variability predicts progression of coronary artery calcification in adults with type 1 diabetes and controls without diabetes. *Diabetes Technol Ther* 12(12): 963-969.
- Fakhrzadeh H, Yamini-Sharif A, Sharifi F, Tajalizadekhoob Y, Mirarefin M, et al. (2012) Cardiac autonomic neuropathy measured by heart rate variability and markers of subclinical atherosclerosis in early type 2 diabetes. *ISRN Endocrinol* 2012: 168264.
- Jung CH, Baek AR, Kim KJ, Kim BY, Kim CH, et al. (2013) Association between Cardiac Autonomic Neuropathy, Diabetic Retinopathy and Carotid Atherosclerosis in Patients with Type 2 Diabetes. *Endocrinol Metab (Seoul)* 28(4): 309-319.
- Canani LH, Copstein E, Pecis M, Friedman R, Leitão CB, et al. (2013) Cardiovascular autonomic neuropathy in type 2 diabetes mellitus patients with peripheral artery disease. *Diabetol Metab Syndr* 5(1): 54.
- Mala S, Potockova V, Hoskovicova L, Pithova P, Brabec M, et al. (2017) Cardiac autonomic neuropathy may play a role in pathogenesis of atherosclerosis in type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 134: 139-144.
- Dayem SM, Battah AA, Bohy Ael M (2015) Cardiovascular Autonomic Neuropathy and Early Atherosclerosis in Adolescent Type 1 Diabetic Patient. *Open Access Maced J Med Sci* 3(4): 681-688.
- Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M, Baradaran A, Nasri H (2014) Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med* 5(8): 927-946.
- Dafaalla MD, Nimir MN, Mohammed MI, Ali OA, Hussein A (2016) Risk factors of diabetic cardiac autonomic neuropathy in patients with type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis. *Open Heart* 3(2): e000336.
- Bissinger A (2017) Cardiac Autonomic Neuropathy: Why Should Cardiologists Care about That? *J Diabetes Res* 2017: 5374176.
- Ziegler D (1994) Diabetic cardiovascular autonomic neuropathy: prognosis, diagnosis and treatment. *Diabetes Metab Rev* 10(4): 339-383.
- Dimitropoulos G, Tahrani AA, Stevens MJ (2014) Cardiac autonomic neuropathy in patients with diabetes mellitus. *World J Diabetes* 5(1): 17-39.
- Yasuda H, Terada M, Maeda K, Kogawa S, Sanada M, et al. (2003) Diabetic neuropathy and nerve regeneration. *Prog Neurobiol* 69(4): 229-285.
- Yagihashi S, Yamagishi S, Wada R (2007) Pathology and pathogenetic mechanisms of diabetic neuropathy: correlation with clinical signs and symptoms. *Diabetes Res Clin Pract* 77 Suppl 1: S184-189.
- Balcioğlu AS, Müderrisoğlu H (2015) Diabetes and cardiac autonomic neuropathy: Clinical manifestations, cardiovascular consequences, diagnosis and treatment. *World J Diabetes* 6(1): 80-91.
- Das Evcimen N, King GL (2007) The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. *Pharmacol Res* 55(6): 498-510.
- Rabinowe SL, Brown FM, Watts M, Smith AM (1990) Complement-fixing antibodies to sympathetic and parasympathetic tissues in IDDM. Autonomic brake index and heart-rate variation. *Diabetes Care* 13(10): 1084-1088.
- Ejskjaer N, Arif S, Dodds W, Zanone MM, Vergani D, et al. (1999) Prevalence of autoantibodies to autonomic nervous tissue structures in Type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med* 16(7): 544-549.



36. Vinik AI, Leichter SB, Pittenger GL, Stansberry KB, Holland MT, et al. (1995) Phospholipid and glutamic acid decarboxylase autoantibodies in diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 18(9): 1225-1232.
37. Zanone MM, Raviolo A, Coppo E, Trento M, Trevisan M, et al. (2014) Association of autoimmunity to autonomic nervous structures with nerve function in patients with type 1 diabetes: a 16-year prospective study. *Diabetes Care* 37(4): 1108-1115.
38. Shigeta H, Yamaguchi M, Nakano K, Obayashi H, Takemura R, et al. (1997) Serum autoantibodies against sulfatide and phospholipid in NIDDM patients with diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 20(12): 1896-1899.
39. Politi C, Ciccacci C, D'Amato C, Novelli G, Borgiani P, et al. (2016) Recent advances in exploring the genetic susceptibility to diabetic neuropathy. *Diabetes Res Clin Pract* 120:198-208.
40. Vojtková J, Ďurdík P, Čiljaková M, Michnová Z, Turčan T, et al. (2013) The association between glutathione S-transferase T1 and M1 gene polymorphisms and cardiovascular autonomic neuropathy in Slovak adolescents with type 1 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 27(1): 44-48.
41. Ciccacci C, Di Fusco D, Cacciotti L, Morganti R, D'Amato C, et al. (2013) TCF7L2 gene polymorphisms and type 2 diabetes: association with diabetic retinopathy and cardiovascular autonomic neuropathy. *Acta Diabetol* 50(5): 789-799.
42. Sivenius K, Niskanen L, Laakso M, Uusitupa M (2003) A deletion in the alpha2B-adrenergic receptor gene and autonomic nervous function in central obesity. *Obes Res* 11(8): 962-970.
43. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology (1996) *Circulation* 93(5): 1043-1065.
44. Spallone V, Maiello MR, Cicconetti E, Pannone A, Barini A, et al. (2001) Factors determining the 24-h blood pressure profile in normotensive patients with type 1 and type 2 diabetes. *J Hum Hypertens* 15(4): 239-246.
45. Spallone V, Bernardi L, Ricordi L, Soldà P, Maiello MR, et al. (1993) Relationship between the circadian rhythms of blood pressure and sympathovagal balance in diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes* 42(12): 1745-1752.
46. Mancia G, Zanchetti A, Agabiti-Rosei E, Benemio G, De Cesaris R, et al. (1997) Ambulatory blood pressure is superior to clinic blood pressure in predicting treatment-induced regression of left ventricular hypertrophy. SAMPLE Study Group. Study on Ambulatory Monitoring of Blood Pressure and Lisinopril Evaluation. *Circulation* 95(6):1464-1470.
47. Verdecchia P, Schillaci G, Guerrieri M, Gatteschi C, Benemio G, et al. (1990) Circadian blood pressure changes and left ventricular hypertrophy in essential hypertension. *Circulation* 81(2): 528-536.
48. Kuwajima I, Suzuki Y, Shimomura T, Kanemaru A, Hoshino S, et al. (1992) Diminished nocturnal decline in blood pressure in elderly hypertensive patients with left ventricular hypertrophy. *Am Heart J* 123(5): 1307-1311.
49. Cuspidi C, Sala C, Tadic M, Gherbesi E, Grassi G, et al. (2016) Nondipping pattern and carotid atherosclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Hypertens* 34(3): 385-391.
50. Lurbe E, Redon J, Kesani A, Pascual JM, Tacons J, et al. (2002) Increase in nocturnal blood pressure and progression to microalbuminuria in type 1 diabetes. *N Engl J Med* 347(11): 797-805.
51. Liatis S, Alexiadou K, Tsiakou A, Makrilakis K, Katsilambros N, et al. (2011) Cardiac autonomic function correlates with arterial stiffness in the early stage of type 1 diabetes. *Exp Diabetes Res* 2011: 957901.
52. Bagherzadeh A, Nejati-Afkham A, Tajallizade-Khoob Y, Shafiee A, Sharifi F, et al. (2013) Association of cardiac autonomic neuropathy with arterial stiffness in type 2 diabetes mellitus patients. *J Diabetes Metab Disord* 12(1): 55.
53. Theilade S, Lajer M, Persson F, Joergensen C, Rossing P (2013) Arterial stiffness is associated with cardiovascular, renal, retinal, and autonomic disease in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 36(3): 715-721.
54. Mangoni AA, Mircoli L, Giannattasio C, Mancia G, Ferrari AU (1997) Effect of sympathectomy on mechanical properties of common carotid and femoral arteries. *Hypertension* 30(5): 1085-1088.
55. Mircoli L, Mangoni AA, Giannattasio C, Mancia G, Ferrari AU (1999) Heart rate-dependent stiffening of large arteries in intact and sympathectomized rats. *Hypertension* 34(4 Pt 1): 598-602.
56. Mangoni AA, Mircoli L, Giannattasio C, Ferrari AU, Mancia G (1996) Heart rate-dependence of arterial distensibility in vivo. *J Hypertens* 14(7): 897-901.
57. Carver TW Jr, Srinathan SK, Velloff CR, Pérez Fontán JJ (1997) Increased type I procollagen mRNA in airways and pulmonary vessels after vagal denervation in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17(6): 691-701.
58. Kacem K, Bonvento G, Seylaz J (1997) Effect of sympathectomy on the phenotype of smooth muscle cells of middle cerebral and ear arteries of hyperlipidaemic rabbits. *Histochem J* 29(4): 279-286.
59. Prince CT, Secrest AM, Mackey RH, Arena VC, Kingsley LA, et al. (2010) Cardiovascular autonomic neuropathy, HDL cholesterol, and smoking correlate with arterial stiffness markers determined 18 years later in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 33(3): 652-657.
60. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, et al. (2000) Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405(6785): 458-462.
61. Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, et al. (2003) Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 421(6921): 384-388.
62. Ulleryd MA, Prah U, Börsbo J, Schmidt C, Nilsson S, et al. (2017) The association between autonomic dysfunction, inflammation and atherosclerosis in men under investigation for carotid plaques. *PLoS One* 12(4): e0174974.
63. Pizzi C, Manzoli L, Mancini S, Bedetti G, Fontana F, et al. (2010) Autonomic nervous system, inflammation and preclinical carotid atherosclerosis in depressed subjects with coronary risk factors. *Atherosclerosis* 212(1): 292-298.